Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

# SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

[illegible] Y [illegible]
[illegible] : [illegible] Folios: 295
Fecha [illegible]: 2000-11-27 17:36:12
[illegible] : [illegible] : REGISTRO/ [illegible]
Dependencia: [illegible] DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

## DATOS DEL SOLICITANTE

1) Nombres y Apellidos o Razón Social: PFIZER INC.

No. de Identificación:

Representante Legal ( Persona Jurídica):

País de Domicilio: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA.

Departamento o Estado: Estado de New York

Dirección: 235 East 42nd Street, New York,

Ciudad:                Teléfono:

## (74) DATOS DEL APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: CALLE 35 No. 7-25 Piso 4

Ciudad. SANTAFE DE BOGOTA                Teléfono: 285-14-00/570-0010

## DATOS DEL INVENTOR

2) Nombre del Inventor (es): GRAHAM NIGEL MAW, CHRISTOPHER PETER WAYMAN.

Identificación:

Dirección:

Ciudad:                Teléfono:

## DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

54) Título de la Invención: COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA DISFUNCIÓN SEXUAL FEMENINA.

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐ TIPO DE PRIORIDAD ANDINA ☐ UNIONISTA ☒

| (33) País | (32) Fecha | (31) No. Solicitud |
|---|---|---|
| UK | Noviembre 8, 1999 | 9926437.6 |
| UK | Febrero 18, 2000 | 0004021.2, |
| UK | Mayo 26, 2000 | |

## RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

## ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica ☒

Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC **14.575** ☒

Recibo de la tasa respectiva ☒

Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras de la publicación ☐

Si se reivindica prioridad Andina:

Copia de la primera solicitud ☐

Traducción oficial ☐

Si se reivindica prioridad Unionista:

Copia certificada de la primera solicitud ☒

Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior

Traducción simple ☒

Capítulo descriptivo ☒

Dibujos, planos necesarios ☒

Capítulo reivindicatorio ☒

Tarjeta archivo propietarios según formato ☒

Tarjeta archivo temático según formato ☒

Extracto para publicación según formato ☒

Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cms ☐

Otros Documentos **Sustitución.** ☒

## SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE CARLOS R. OLARTE CC. 79.782.747 de Bogotá T.P.No. 74.295

3

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
adicacion : 00084519 [illegible]  Folios: 2528
echa (RAD): 2000-11-07 17:36:12
Tramite. : 032 PATENTES D  1 REGISTRO/ 411 REGISTRO
ependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 64,306
FECHA : OCTUBRE 12 DE 2000

##### C O N S I G N A C I O N #####

| DEPOSITANTE | TIPO PAGO | BANCO | SUCURSAL | CUENTA | No. PAGO | Vr. PAGO |
|---|---|---|---|---|---|---|
| JORGE LUIS GOMEZ | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | BOGOTA | 050-00110-6 | 3118683 | 43,175,000.00 |

##### C O N C E P T O #####

| CANT. | RENTISTICO | | CONCEPTO | TOTAL CONCEPTO |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 50005-01-01 | SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 608,000.00 |
| | | | TOTAL : $ | 608,000.00 |

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : ______________________

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.______________________

Señores
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

Ref.: Nueva solicitud de Patente de Invención
Titulada : "COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO
DE LA DISFUNCION SEXUAL FEMENINA".
Solicitante : PFIZER INC.

JAMES W. F. RAISBECK, mayor y vecino de Santa Fe de Bogotá. D.C., identificado como aparece al pie de mi firma, actuando en mi carácter de apoderado de la sociedad de la referencia, respetuosamente me permito manifestar que SUSTITUYO el poder a mi conferido por la mencionada sociedad en el doctor CARLOS R. OLARTE, identificado con la Cédula de Ciudadanía número 79.782.747 de Bogotá y con la Tarjeta Profesional número 74.295.

El apoderado sustituto queda con las mismas facultades del principal.

Atentamente,

JAMES W. F. RAISBECK
C.C. No: 2.863.777 de Bogotá
T. P. No.1.341

CRO/luz

**DILIGENCIA DE RECONOCIMIENTO**
**Y PRESENTACION PERSONAL**

Ante el Notario Once del Circulo de Santafé de Bogotá, compareció [illegible]

Quién exhibió la C.C. No. [illegible]

expedida en Bz T.P. —

y declaró que la firma y huella que aparecen en el presente memorial son suyas y que el contenido del mismo es cierto.

Memorial dirigido a interesado

Santafé de Bogotá D.C. 31 MAY 2000

Firma del Declarante

HUELLA

Autorizó la anterior Diligencia

NOTARIO ONCE DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA

ZULMA NAVARRO DE BAUTI

[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

5

# OFICINA DE PATENTES

**Oficina de Patentes**
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

El abajo firmante, siendo funcionario debidamente autorizado de acuerdo con la Sección 74(1) y (4) de la Ley de 1994 de Regulación y Contratación exterior, para firmar y expedir certificados por cuenta del Interventor General, certificó que, adjunto al presente documento se encuentra una copia exacta de los documentos presentados originalmente con relación a la solicitud de Patente identificada aquí.

Si, de acuerdo con las Normas de Patentes de 1.982 (Re-registro de Compañías) una compañía nombrada en el presente certificado y en cualesquiera documentos que lo acompañan ha sido re-registrada al amparo de la Ley de Sociedades de 1.980 con el mismo nombre con el cual había sido registrada inmediatamente antes de su re-registro salvo la sustitución, o la inclusión, como última parte del nombre, de las palabras "sociedad de responsabilidad limitada" o sus equivalentes en Galés, las referencias al nombre de la compañía en este certificado y en cualesquiera documentos que le acompañan deberán ser tratados como referencias al nombre con el cual esté re-registrada.

De acuerdo con las reglas, las palabras "sociedad a responsabilidad limitada" pueden ser sustituidas por p.l.c., plc. P.L.C. o PLC.

El re-registro bajo la Ley de Sociedades no constituye una nueva entidad legal sino que somete simplemente la sociedad a ciertas normas adicionales de la Ley de sociedades.

Firmado: Ilegible

Fecha: 2 agosto 2000

Agencia Ejecutiva del Ministerio de Comercio e Industria

[illegible] MORENO

IMPRESO 1/77
Ley de Patentes 1977
(Regla 16)

1/77

6

# OFICINA DE PATENTES

**Solicitud de concesión de una patente**
**(ver las notas por detrás de este impreso.**
**También puede conseguir un folleto explicatorio**
**de la Oficina de Patentes para rellenar este impreso)**

**Oficina de Patentes**
**Cardiff Road**
**Newport**
**Gwent NP9 1RH**

---

1. Su referencia — P7553.GB

---

2. Solicitud de patente número — 9926437.6
(La Oficina de Patentes rellenará este apartado)

---

3. Nombre completo, dirección y código postal del solicitante o solicitantes (subrayar los apellidos)

Pfizer Limited
Ramsgate Road
Sandwich
Kent
CT13 9NJ

Número de ADP (si se conoce) — 1271001

Si el solicitante el una empresa, indicar el país/estado de su incorporación — REINO UNIDO

---

4. Título de la invención — PRODUCTO FARMACÉUTICO

---

5. Nombre de su agente (si lo tiene)

D. YOUNG & CO
21 NEW FETTER LANE
LONDON
EC4A 1DA

"Dirección" en el Reino Unido donde debería enviarse toda la correspondencia. (incluyendo el códico postal)

Número de ADP (si lo conoce) — 59006

---

6. Si va a declarar prioridad por una o más solicitudes de patentes anteriores, indice el país y la fecha de solicitud de cada una de las solicitudes anteriores (si lo conoce) y el número de solicitud de las mismas

País — número de solicitud de prioridad (si lo conoce) — Fecha (día/mes/año)

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

7. Si esta solicitud es una divisional o derivada de una solicitud británica anterior, indicar el número y fecha de la solicitud anterior

| Número de la solicitud anterior | Fecha de solicitud |
|---|---|
| | |

---

8. ¿Se requiere una declaración de inventor y de derecho de concesión de una patente para mantener esta petición? (responder si en caso: SI
   - a) algún solicitante nombrado en el apartado 3 no es un inventor, o
   - b) hay un inventor quien es nombrado como un solicitante, o
   - c) algún solicitante nombrado es una empresa

   Ver nota (d)

---

9. Poner el número de páginas para cada uno de los siguientes requisitos que está solicitando en este impreso.
   No contar copias del mismo documento

Hojas de continuación de este impreso

| | |
|---|---|
| Descripción | 120 |
| Reivindicaciones | 3 |
| Resumen | 1 |
| Dibujos | 8 |

---

10. Si también está solicitando alguna de las siguientes, declare cuantos de cada requisito.

Documentos de Prioridad

Traducción de los Documentos de Prioridad

Declaración de los inventores y derecho
de concesión de una patente
(impreso de patente 1/77)

Solicitud de examen preliminar y búsqueda
(impreso de patente 1/77)

Solicitud de examen substantivo
(impreso de patente 1/77)

Otros documentos. (especificar)

---

11. Solicitamos la concesión de una patente basada ne esta solicitud
Firma Ilegible Fecha 5 de noviembre de 1999
D YOUNG & CO
Agentes de los solicitantes

PATEN [illegible] MADRID
Telf. [illegible]

12. Nombre y número de teléfono de la
persona de contacto en el Reino Unido

**Advertencia**
Despues de haber sido presentada una solicitud de Patente, el Interventor de la Oficina de Patentes estudiará si la publicación o la comunicación de la invención ha de ser prohibida o restringida de acuerdo con la Sección 22 de la Ley de Patentes de 1.997, y dará a conocer al solicitante si esta prohibición o esta restricción es necesaria. Se recuerda igualmente a los solicitantes que residen en el Reino Unido que las solicitudes no pueden ser presentadas fuera del país sin autorización escrita a no ser que una solicitud haya sido presentada en un plazo no inferior a 6 semanas, anteriormente, en el Reino Unido para una patente relacionada con la misma invención y si no se les ha dado ninguna instrucción prohibiendo la publicación o la comunicación o la revocación de esta instrucción.

**Notas**
[illegible] Si usted necesita ayuda para rellenar este impreso o tiene alguna pregunta, por favor póngase en contacto con la Oficina de Patentes en 0645 500505
b) Sírvanse escribir a máquina, o con tinta negra utilizando letras mayúsculas. Una
c) Si no hay suficiente espacio para todos los detalles pertinentes en cualquier apartado de este impreso, por favor continúe en hoja aparte y escriba "ver hoja complementaria" en la parte(s) pertinente. Cualquier hoja complementaria debería adjuntarse a este impreso.
d) Si usted ha contestado "Si" necesitará rellenar el impreso de patente 7/77.
f) Para los detalles de la tasa y forma de pago, sírvanse consultar la Oficina de Patentes

[illegible]

GB 9926437.6 solicitada el 9 de noviembre de 1999

# PRODUCTO FARMACEUTICO

## AMBITO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un producto farmacéutico que es útil para el tratamiento de la disfunción sexual femenina (FSD), en particular de trastornos de la excitación sexual femenina (FSAD).

La presente invención se refiere también a un procedimiento de tratamiento de la FSD, en particular de los FSAD.

La presente invención se refiere también a ensayos para rastrear compuestos útiles en el tratamiento de la FSD, en particular de los FSAD.

Por conveniencia, se presenta una lista de las abreviaturas que se utilizan en el siguiente texto antes de la sección de reivindicaciones.

## RESPUESTA SEXUAL FEMENINA

La fase de excitación de la respuesta sexual femenina no se distinge fácilmente de la fase de deseo hasta que empiezan a tener lugar cambios fisiológicos en la vagina y clítoris así como en otros órganos sexuales. La excitación y placer sexuales están acompañados de una

combinación de eventos vasculares y neuromusculares que conducen a la congestión del clítoris, labios y pared vaginal, a un aumento de la lubricación vaginal y de la dilatación del lumen vaginal (Levin, 1980, Ottesen, 1983, Levin, 1991, Levin, 1992, Sjoberg, 1992, Wagner, 1992, Schiavi et al., 1995, Masters et al., 1996, Berman et al., 1999).

La congestión vaginal posibilita que tenga lugar la trasudación, y este proceso es responsable del aumento de la lubricación vaginal. La trasudación permite un flujo de plasma a través del epitelio sobre la superficie de la vagina, cuya fuerza motriz es el aumento del flujo sanguíneo en el lecho capilar vaginal durante el estado excitado. Además, la congestión conduce a un aumento de la longitud vaginal y del diámetro luminal, especialmente en los dos tercios distales del canal vaginal. La dilatación luminal de la vagina se debe a una combinación de la relajación del músculo liso de esta pared y la relajación del músculo esquelético de los músculos del suelo pélvico. Algunos trastornos de dolor sexual, como el vaginismo, se piensa que son debidos, al menos en parte, a una inadecuada relajación que evita la dilatación de la vagina, todavía debe determinarse si este es un problema principalmente del músculo liso o del esquelético. (Levin, 1980, Ottesen,

PATRICIA [illegible]
RID

1983, Levin, 1991, Sjoberg, 1992, Wagner, 1992, Schiavi et al., 1995, Master et al., 1996, Berman et al., 1999).

La vasculatura y microvasculatura de la vagina están inervadas por nervios que contienen neuropéptidos y otros candidatos a neurotransmisores. Estos incluyen el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), el neuropéptido Y (NPY), la óxido nítrico sintasa (NOS), la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), (Hoyle et al., 1996). Los péptidos que están presentes en el clítoris se discuten a continuación. La óxido nítrico sintasa, que se localiza a menudo con el VIP, muestra una mayor expresión, inmunológicamente, en las arterias y venas profundas que en los vasos sanguíneos propios (Hoyle et al., 1996).

## DISFUNCION SEXUAL FEMENINA

Se sabe que algunos individuos pueden sufrir disfunción sexual femenina (FSD).

La FSD se define como la dificultad o incapacidad de una mujer para encontrar satisfación en la expresión sexual. La FSD es un término colectivo para varios trastornos sexuales femeninos (Leiblum, 1998, Berman et al., 1999). La mujer puede tener falta de deseo, dificultad con la

excitación o el orgasmo, dolor en el coito o una combinación de estos problemas. Algunos tipos de enfermedades, medicaciones, heridas o problemas psicológicos pueden producir la FSD. Los tratamientos en desarrollo están dirigidos a tratar tipos específicos de la FSD, predominantemente los trastornos de deseo y excitación.

Las categorías de la FSD se definen mejor por contraste con las fases de la respuesta sexual femenina normal: deseo, excitación y orgasmo (Leiblum, 1998). El deseo o líbido es el motor de la expresión sexual, y sus manifestaciones incluyen a menudo pensamientos sexuales junto con un compañero interesado o al exponerse a otros estímulos sexuales. La excitación es la respuesta vascular a la estimulación sexual, un componente importante de la cual es la lubricación vaginal y la elongación de la vagina. El orgasmo es la liberación de la tensión sexual que ha culminado durante la excitación.

Por ello, la FSD aparece cuando una mujer tiene una respuesta inadecuada o insatisfactoria en cualquiera de estas fases, habitualmente deseo, excitación u orgasmo. Las categorías de la FSD incluyen: trastorno del deseo sexual hipoactivo, trastorno de la excitación sexual, trastornos

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 13
C [illegible] ADRID
TEL. [illegible]

rgásmicos y trastornos de dolor sexual.

El trastorno del deseo sexual hipoactivo está presente si una mujer no tiene deseo, o tiene poco, de ser sexual, y no tiene pensamientos o fantasías sexuales, o tiene pocos. Este tipo de la FSD puede producirse por niveles bajos de testosterona, debidos a la menopausia natural o a la menopausia quirúrgica. Otras causas incluyen enfermedad, medicaciones, fatiga, depresión y ansiedad.

El trastorno de la excitación sexual (FSAD) se caracteriza por una respuesta genital inadecuada a la estimulación sexual. Los genitales no experimentan la congestión que caracteriza a la excitación sexual normal. Las paredes vaginales están poco lubricadas, de modo que el coito es doloroso. Los orgasmos pueden estar imposibilitados. El trastorno de la excitación puede estar producido por una reducción de estrógenos en la menopausia o después de un parto y durante la lactancia, así como por enfermedad, con componentes vasculares como diabetes y aterosclerosis. Otras causas son resultado del tratamiento con agentes diuréticos, antihistamínicos, antidepresivos, por ejemplo SSRI, o antihipertensivos.

Los trastornos de dolor sexual (que incluyen dispareunia

PATRICIA [illegible]
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

y vaginismo) se caracterizan por dolor como resultado de la penetración y pueden estar causados por medicaciones que reducen la lubricación, endometriosis, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad intestinal inflamatoria o problemas del tracto urinario.

La prevalencia de la FSD es difícil de calibrar debido a que el término cubre varios tipos de problemas, algunos de los cuales son difíciles de medir, y debido a que el interés por tratar la FSD es relativamente reciente. Muchos problemas sexuales de las mujeres están asociados directamente al proceso de envejecimiento femenino o a enfermedades crónicas como diabetes e hipertensión.

Existen amplias variaciones en la incidencia y prevalencia de la FSD descritas, explicadas en parte por el uso de criterios de evaluación diferentes, pero la mayoría de los investigadores comunica que una proporción significativa de mujeres por lo demás sanas tiene síntomas de uno o más de los subgrupos FSD.

Como ejemplo, los estudios que comparan la disfunción sexual en parejas revelan que el 63% de las mujeres tienen disfunción de la excitación o del orgasmo, comparado con el 40% de los hombres que tienen disfunción eréctil o

PATRICIA [illegible]
[illegible] MADRID

eyaculatoria (Frank et al., 1978).

Sin embargo, la prevalencia del trastorno de la excitación sexual femenina varía considerablemente de estudio a estudio. En un reciente estudio de National Health and Social Life, el 19% de las mujeres comunicaron dificultades de lubricación, mientras que el 14% de las mujeres pacientes ambulatorias de una clínica ginecológica comunicaron dificultades similares con la lubricación (Rosen et al., 1993).

Varios estudios han informado también acerca de disfunción de la excitación sexual en mujeres diabéticas (hasta un 47%), incluyendo la reducción de la lubricación vaginal (Wincze et al., 1993). No hubo asociación entre neuropatía y disfunción sexual.

Numerosos estudios han mostrado también que entre un 11-48% de mujeres en conjunto pueden tener un deseo sexual reducido con la edad. De forma similar, entre 11-50% de las mujeres comunican problemas con la excitación y la lubricación, y por lo tanto experimentan dolor en el coito. El vaginismo es menos común, afectando aproximadamente al 1% de las mujeres.

Los estudios de mujeres sexualmente experimentadas han detallado que el 5-10% tienen anorgasmia primaria. Otro 10% tiene orgasmos infrecuentes y otro 10% los experimenta inconsistentemente (Spector et al., 1990).

Debido a que la FSD consiste en varios subtipos que expresan síntomas en fases separadas del ciclo de respuesta sexual, no hay una terapia única. El tratamiento actual de la FSD se enfoca principalmente a temas psicológicos y de relación. El tratamiento de la FSD evoluciona gradualmente según se dedican más estudios clínicos y de ciencia básica a la investigación de este problema médico. Las dolencias sexuales femeninas no son todas psicológicas en su patofisiología, especialmente para aquellos individuos que pueden tener un componente de disfunción vasculogénica (por ejemplo FSAD) que contribuye a la dolencia sexual femenina en conjunto. No existen actualmente fármacos autorizados para el tratamiento de la FSD. La terapia de medicamentos empírica incluye la administración de estrógenos (tópicamente o en forma de una terapia de sustitución hormonal), andrógenos o medicamentos de alteración del ánimo como buspirona o trazodona. Estas opciones de tratamiento a menudo son insatisfactorias debido a la baja eficacia o a efectos secundarios inaceptables.

PATENTES [illegible] MADRID

Puesto que el interés en tratar la FSD farmacológicamente es relativamente reciente, la terapia consiste en los siguiente: consejo psicológico, lubricantes sexuales sin receta médica y candidatos investigacionales, incluyendo medicamentos aprobados para otras dolencias. Estos medicamentos consisten en agentes hormonales, testosterona o combinaciones de estrógeno y testosterona, y más recientemente, medicamentos vasculares que se han mostrado eficaces en la disfunción eréctil masculina. Ninguno de estos agentes ha demostrado ser muy eficaz para tratar la FSD.

## TRASTORNO DE LA EXCITACION SEXUAL FEMENINA (FSAD)

El manual de diagnóstico y estadística (DSM) IV de la Asociación Psiquiátrica Americana define el trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) como:

> "una *incapacidad persistente o recurrente para alcanzar o mantener hasta la terminación de la actividad sexual una respuesta adecuada de lubricación-tumefacción de la excitación sexual. La alteración produce una notable tensión o dificultades interpersonales.*"

PATRICIA ... MORENO
... MADRID

La respuesta de excitación consiste en vasocongestión de la pelvis, lubricación vaginal y expansión y tumefacción de los genitales externos. La alteración produce una notable tensión y/o dificultades interpersonales. Los estudios que investigan la disfunción sexual en parejas revelan que el 63% de las mujeres tienen disfunción de la excitación o del orgasmo.

El FSAD es un trastorno sexual altamente prevalente que afecta a mujeres pre-, peri- y postmenopáusicas (±HRT). Está asociado a trastornos concomitantes como depresión, enfermedades cardiovasculares, diabetes y trastornos UG.

Las consecuencias primarias del FSAD son la falta de congestión/tumefacción, falta de lubricación y falta de sensación genital placentera. Las consecuencias secundarias del FSAD son una reducción del deseo sexual, dolor durante el coito y dificultades para conseguir un orgasmo.

Recientemente se ha hipotetizado que existe una base vascular para al menos una parte de las pacientes con síntomas del FSAD (Goldstein et al., 1998) con datos animales que apoyan esta perspectiva (Park et al., 1997).

Los medicamentos candidatos para el tratamiento del FSAD, en los que se está investigando su eficacia, son principalmente terapias de disfunción eréctil que potencian la circulación en los genitales masculinos. Consisten en dos tipos de formulación: medicación oral o sublingual (apomorfina, fentolamina, sildenafilo) y prostaglandina ($PGE_1$) que se inyecta o administra transuretralmente en hombres, y tópicamente en los genitales de las mujeres. Sin embargo, ninguna de estas terapias es eficaz.

La presente invención trata de proporcionar un medio eficaz de tratamiento de la FSD.

## ASPECTOS DEL SUMARIO DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se basa en los descubrimientos según los cuales el FSAD está asociado a una reducción del flujo sanguíneo genital. El tratamiento de mujeres con FSAD puede llevarse a cabo por estimulación del flujo sanguíneo genital con agentes vasoactivos. Los presentes autores han mostrado claramente que el cAMP media en la vasorrelajación vaginal y que el flujo sanguíneo vaginal puede estimularse/potenciarse por elevación de los niveles de cAMP. Este es el descubrimiento base.

A este respecto, nadie ha propuesto anteriormente que el

[illegible] MADRID

FSAD pueda tratarse de tal manera, es decir, elevación directa o indirecta de los niveles de cAMP. Además, no hay explicaciones en la técnica que sugieran que el FSAD estaba asociado a una modulación perjudicial de la actividad y/o niveles de cAMP o que el cAMP es responsable de la mediación en la vasorrelajación vaginal. Por ello, la presente invención es sorprendente.

Por ello, en un aspecto amplio, la presente invención se refiere al uso de un potenciador de cAMP para tratar la FSD, en particular el FSAD.

La presente invención es ventajosa porque proporciona un medio para restablecer una respuesta de excitación sexual normal, es decir, un aumento del flujo sanguíneo genital que conduce a la congestión vaginal y labial. Esto resultará en un aumento de la lubricación vaginal por trasudación de plasma, un aumento de la flexibilidad vaginal y un aumento de la sensibilidad vaginal. Por ello, la presente invención proporciona un medio para restablecer, o imitar, la respuesta de excitación sexual normal.

...MORENO
...AN
... 113
...ADRID

ASPECTOS DETALLADOS DE LA PRESENTE INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso consiguiente en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una mujer que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, siendo capaz el agente de potenciar cAMP en los genitales de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la mujer, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o

[illegible] ADRID

excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto un agente con cAMP, y medir la actividad de cAMP, siendo una potenciación del cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de: (a) realizar el ensayo según la presente invención, (b) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente la actividad de cAMP y (c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de la FSD, en particular FSAD, por potenciación in vivo de cAMP con un agente, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP en un procedimiento de ensayo in vitro, siendo el procedimiento de ensayo in vitro el procedimiento de ensayo según la presente invención.

[illegible] MORENO
MADRID
Tel.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP al ensayarlo in vitro mediante el procedimiento de ensayo según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un modelo animal utilizado para identificar agentes capaces de tratar FSD (en particular FSAD), comprendiendo el citado modelo un animal hembra anestesiado incluyendo los medios para medir cambios en el flujo sanguíneo vaginal del citado animal después de la estimulación del nervio pélvico de éste.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: administrar un agente al modelo animal de la presente invención y medir cualquier potenciación de cAMP y/o cualquier aumento del flujo sanguíneo en la vagina del citado animal.

Para facilitar la referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se discuten ahora en los encabezados de

PATRI... MORENO
... MADRID

24

sección apropiados. Sin embargo, las explicaciones de cada sección no están limitadas necesariamente a cada sección particular.

ASPECTOS PREFERIDOS

Preferiblemente el agente es para el tratamiento de los FSAD.

Preferiblemente el agente es un mediador de la vasorrelajación vaginal.

En una realización, el agente es preferiblemente para administración oral.

En otra realización, el agente puede ser para administración tópica.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un efecto potenciador sobre cAMP. Expresado como alternativa, para algunas aplicaciones el agente no tiene preferiblemente un efecto potenciador directo sobre cAMP. Un ejemplo de agente que tiene un efecto potenciador directo es VIP administrado exógenamente. Sin embargo, se comprende que, en este aspecto preferido, el agente puede

MORENO
.13
MADRID

25

tener un efecto potenciador indirecto sobre cAMP al actuar sobre los agentes de actuación directa de origen y localización natural, como los VIP de origen y localización natural.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un inhibidor, es decir, es capaz de exhibir una función inhibidora.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:PDEII.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NEP.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:PDEII selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NEP selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente preferiblemente no produce, o es administrado de forma que no la produzca, una caída prolongada de la presión sanguínea (por ejemplo durante un periodo de alrededor de 5 minutos o más). En

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
Tel. [illegible]

esta realización, si el agente se administra tópicamente, entonces dicho agente puede tener la capacidad de producir una caída de la presión sanguínea (como si se suministrase por vía intravenosa), siempre que en la aplicación tópica pasen unos niveles mínimos de agente al torrente sanguíneo. Para un agente oral se prefiere que el agente no produzca una caída prolongada de la presión sanguínea.

En un aspecto preferido el agente no produce, o es administrado de forma que no produzca, un gran cambio en el ritmo cardiaco.

POTENCIACION de cAMP

Como se utiliza en la presente con referencia al cAMP, el término "potenciación" incluye cualquiera de: aumento de la eficacia de cAMP, aumento de los niveles de cAMP, aumento de la actividad de cAMP, reducción del nivel de la degradación de cAMP, reducción del nivel de inhibición de cAMP.

El efecto potenciador puede ser un efecto directo. Un ejemplo de efecto directo sería la sobrerregulación de los niveles de cAMP por un agente que aumenta la expresión de éste.

PATENT [illegible] MADRID

27

Como alternativa, el efecto potenciador podría ser un efecto indirecto. Un ejemplo de dicho efecto sería la acción sobre una sustancia que, de otra manera, inhibiría y/o reduciría los niveles y/o actividad de cAMP. Otro ejemplo de dicho efecto sería el aumento de la acción de una sustancia que aumenta la eficacia de cAMP, aumenta los niveles de cAMP, aumenta la actividad de CAMP, reduce el nivel de degradación de cAMP o reduce el nivel de inhibición de cAMP.

Como alternativa, el agente puede actuar incluso como un mimético de cAMP.

Miméticos de cAMP

Como se utiliza en la presente, el término "mimético de cAMP" significa un agente que puede actuar de modo similar al cAMP en los genitales sexuales femeninos, y hacerlo mediante uno o más de: aumento de la eficacia de los restos similares a cAMP, aumento de los niveles de los restos similares a cAMP, aumento de la actividad de los restos similares a cAMP, reducción del nivel de degradación de los restos similares a cAMP, reducción del nivel de inhibición de los restos similares a cAMP.

MORENO
MADRID

De esta manera, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso consiguiente en el tratamiento de los FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

De esta manera, en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de los FSAD, siendo el agente capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

De esta manera, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente en una cantidad tal que imita la potenciación de los niveles de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un ejemplo de mimético de cAMP sería la forscolina. Hemos encontrado que la forscolina aumenta el flujo sanguíneo vaginal y puede actuar también como relajante vaginal.

En un aspecto preferido, el mimético de cAMP se administra oralmente.

## ACTIVADOR DE cAMP

Como se utiliza en la presente, el término "activador de cAMP" significa una sustancia que controla o libera cAMP en los genitales sexuales femeninos. El control puede ser directo o indirecto. Para facilitar la referencia se hace referencia a estas sustancias como $A_{cAMP}$.

## DIANA

El término "diana" como se utiliza en la presente con referencia a la presente invención significa cualquier sustancia que sea cAMP, un $A_{cAMP}$, un $I_{cAMP}$ o un $AM_{cAMP}$. Expresado de otra manera, la diana puede referirse como una diana $P_{cAMP}$.

La diana del agente de la presente invención puede ser una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos

ADRID

que codifica la misma y/o una unidad de expresión responsable de la expresión de la misma y/o un modulador de la misma.

La diana puede ser incluso una combinación de dichas dianas.

AGENTE

El agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como una $P_{CAMP}$.

El agente puede ser una secuencia de aminoácidos o un derivado químico de ésta. La sustancia puede ser incluso un compuesto orgánico u otro compuesto químico. El agente puede incluso ser una secuencia de nucleótidos, que puede ser una secuencia con sentido o una secuencia sin sentido. El agente puede ser incluso un anticuerpo.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, tal como cuando el agente es un I:NEP, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente un grupo amida (es decir N(H)-C(O)- o incluso -C(O)-N(H)-) y uno o más grupos hidrocarburo. En este caso, el término "grupo hidrocarburo" significa un grupo que comprende al

PATRICIA ... MORENO ... RID

menos C y H y puede comprender opcionalmente uno o más sustituyentes adecuados. Ejemplos de dichos sustituyentes pueden incluir halo, alcoxi, nitro, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes pueden formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarburo comprende más de un C, estos carbonos no tienen porque estar unidos necesariamente unos a otros. Por ejemplo, al menos dos de los carbonos pueden estar unidos a través de un elemento o grupo adecuado. De esta manera, el grupo hidrocarburo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente un grupo cíclico. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente un grupo cíclico unido a otro grupo hidrocarburo por medio de un enlace amida. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, tal como cuando el agente es un I:PDE, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente dos o más grupos hidrocarburo unidos. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente al menos

MADRID

dos grupos cíclicos, siendo opcionalmente uno de dichos grupos cíclicos una estructura de anillo cíclico condensado. Para algunas aplicaciones, al menos uno de los grupos cíclicos es preferiblemente un grupo heterocíclico. Para algunas aplicaciones, el grupo heterocíclico comprende preferiblemente al menos un N en el anillo. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

El $P_{cAMP}$ puede realizar una o más de las siguientes funciones: aumentar directa o indirectamente la eficacia del cAMP, aumentar directa o indirectamente los niveles de cAMP, aumentar directa o indirectamente la actividad de cAMP, reducir directa o indirectamente el nivel de degradación de cAMP o reducir directa o indirectamente el nivel de inhibición de cAMP.

Preferiblemente, el agente aumenta directa o indirectamente los niveles de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

Más preferiblemente, el agente aumenta selectivamente y directa o indirectamente los niveles de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

MORENO
MADRID

En un aspecto, el agente puede inhibir o antagonizar una diana adecuada y, al hacerlo, potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales femeninos. En el texto se ha utilizado el término inhibidor para significar un inhibidor y/o un antagonista.

En otro aspecto, el agente puede activar o agonizar una diana adecuada y, al hacerlo, potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales femeninos. En el texto se han utilizado los términos activador e inhibidor de sobrerregulación para significar un activador y/o un sobrerregulador y/o un agonista.

De esta manera, el agente puede agonizar, antagonizar, sobrerregular o inhibir una diana adecuada.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, o además, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

Preferiblemente, el agente puede agonizar selectivamente, antagonizar selectivamente, sobrerregular selectivamente o inhibir selectivamente una diana adecuada.

PATRICIA
MADRID

Preferiblemente, el agente puede agonizar selectivamente, antagonizar selectivamente, sobrerregular selectivamente o inhibir selectivamente una diana selectiva adecuada.

El agente de la presente invención puede ser capaz también de mostrar una o más propiedades funcionales beneficiosas adicionales. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede potenciar cAMP así como potenciar cGMP. Para algunas aplicaciones (tal como para administración tópica), el agente puede mostrar también una acción inhibidora de ACE (enzima conversora de angiotensina). Para algunas aplicaciones (tal como con tipos particulares de paciente), dichos agentes (es decir aquellos que muestran acción inhibidora de ACE) pueden no ser adecuados para administración oral. Para algunas aplicaciones el agente puede mostrar también una acción inhibidora de ECE (enzima conversora de endotelio).

En un aspecto altamente preferido el agente no es VIP administrado exógenamente.

Esto es debido a que ha habido informes de que las infusiones de VIP conducen a efectos cardiovasculares adversos significativos, como aumentos del ritmo cardiaco y reducción de la presión sanguínea arterial diastólica

35

(Ottesen 1983, 1987, 1995).

Además, aunque Ottesen y colaboradores han demostrado que VIP induce aumentos en el flujo sanguíneo vaginal y en la lubricación en voluntarias sanas, el mecanismo por el cual VIP ejerce sus efectos no está claro. En la bibliografía, existe una serie de ejemplos de señalización de VIP mediante distintos sistemas de segundo mensajero, por ejemplo cGMP/guanilato ciclasa (Ashur-Fabian, 1999), monóxido de carbono (CO)/hemo oxigenasa (Fan et al., 1998) y cAMP/adenilato ciclasa (Foda, 1995, Schoeffter, 1985, Gu, 1992). Esto se ejemplifica en un informe reciente que describe cómo pueden explicarse los efectos vasorrelajantes de VIP en la arteria uterina por la liberación de óxido nítrico (Jovanovic, 1998). De nuevo, existen también evidencias de modulación de VIP por óxido nítrico (NO)/cGMP en la función urogenital masculina (Kim, 1994).

Por ello, es deseable que el agentes no sea VIP administrado exógenamente por sí solo. Sin embargo, la presente invención comprende combinaciones de agentes, siendo uno de estos agentes VIP. Sin embargo, se prefiere que ninguno de los agentes sea VIP administrado exógenamente por las razones anteriormente citadas.

El agente puede utilizarse en combinación con uno o más agentes farmacéuticamente activos como un $P_{cAMP}$ (Como Sildenafilo) y/o un compuesto farmacéutico de actuación central (por ejemplo un agonista de dopamina, como apomorfina).

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un valor de $K_i$ inferior a aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un valor de $K_b$ inferior a aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

[illegible] MADRID

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un valor de $K_a$ inferior a aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 100 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 150 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 200 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 250 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 300 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 350 veces hacia la diana deseada.

Para algunas aplicaciones, el agente puede ser un agente vasoactivo.

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID

POTENCIACION DE cGMP

Como se utiliza en la presente con referencia al cGMP, el término "potenciar" incluye uno o más de: aumento de la eficacia del cGMP, aumento de los niveles de cGMP, aumento de la actividad de cGMP, reducción del nivel de degradación de cGMP, reducción del nivel de inhibición de cGMP.

El efecto potenciador puede ser un efecto directo. Como alternativa, podría ser un efecto secundario y/o un efecto cadena abajo.

En este caso, el agente que potencia el cGMP actúa preferiblemente como un $I_{cGMP}$ y/o un $AM_{cGMP}$, teniendo el modulador de cGMP un efecto adverso sobre cGMP, de modo que el agente reduce y/o elimina y/o enmascara y/o desvía el efecto perjudicial del $I_{cGMP}$ y/o del $AM_{cGMP}$ hacia cGMP.

Por ello, la presente invención comprende una combinación de uno o más $I{:}I_{cAMP}$ y uno o más $I{:}I_{cGMP}$.

En un aspecto, el $I{:}I_{cGMP}$ es un $I{:}PDE_{cGMP}$.

## $I_{cAMP}$ Y/O $AM_{cAMP}$

Se ha mostrado que el cAMP media el flujo sanguíneo vaginal y que estimulando la señalización de cAMP se puede estimular el flujo sanguíneo vaginal en un modelo animal. Así, un agente que sobrerregula/estimula la vasorrelajación mediada por cAMP será eficaz en el tratamiento de los FSAD. Para facilitar la referencia, nos referimos a estas sustancias como $I_{cAMP}$ y/o $AM_{cAMP}$. En este caso, los $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ tienen un efecto adverso sobre los niveles de actividad de cAMP.

Por ello, el agente puede ser uno o más de: un I:$I_{cAMP}$ y/o un I:$AM_{cAMP}$.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

Los ejemplos de $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ incluyen uno o más de PDE, NPY y NEP, o cualquier componente asociado con éstos. El componente asociado puede ser, por ejemplo, un receptor y/o un cofactor.

MORENO
AN
ADRID

De esta manera, el agente puede ser preferiblemente uno o más de: un I:$PDE_{cAMP}$, un I:NPY, un I:NPY $Y_n$ y un I:NEP.

De manera similar, el agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

## I:$I_{cAMP}$ Y/O I:$AM_{cAMP}$

Según la presente invención, se ha encontrado que es posible tratar y/o prevenir el FSAD utilizando un agente que reduce y/o elimina y/o enmascara y/o desvía y/o previene el efecto perjudicial de $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ hacia cAMP. El agente puede incluso restablecer los niveles de cAMP que habían reducido el $I_{cAMP}$ y el $AM_{cAMP}$. En este caso, el I:$I_{cAMP}$ e I:$AM_{cAMP}$ previenen o reducen el efecto adverso sobre los niveles de actividad del cAMP.

De esta manera, en un aspecto preferido, el agente es un I:$I_{cAMP}$ y/o un I:$AM_{cAMP}$, teniendo el $AM_{cAMP}$ un efecto perjudicial sobre $AM_{cAMP}$.

En un aspecto preferido, el agente puede ser uno o más de:

PATRICIA ... MORENO
... MADRID

I:$PDE_{cAMP}$

I:$PDEn_{cAMP}$ (donde n indica una clase o subclase apropiada)

I:NPY

I:NPY $Y_n$ (donde n indica una clase o subclase apropiada)

I:NEP

**$A_{cAMP}$**

Según la presente invención, se ha encontrado que una de las causas importantes de los FSAD es debida a los bajos niveles o a la baja actividad de cAMP en los genitales femeninos.

Por ello, el agente puede ser un U:$A_{cAMP}$.

Ejemplos de $A_{cAMP}$ incluyen VIP y AC, o cualquier componente asociado a ellos. El componente asociado puede ser, por ejemplo, un receptor y/o un cofactor.

De esta manera, el agente puede ser preferiblemente uno o más de: A:AC, A:VIPr, A:$VIP_n$, I:I:VIPr o I:I:$VIP_n$.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son

PAT[illegible] [illegible] MORENO
[illegible] Y [illegible] [illegible]AN
[illegible] 113
C. [illegible]
Telf. [illegible] - MADRID

capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

$U{:}A_{cAMP}$

En otro aspecto, la diana es preferiblemente un componente que aumenta el nivel de cAMP. Por ello, el agente puede ser un U:AC.

Como ejemplo, la diana puede ser el cAMP mismo o AC o VIP (o combinaciones de éstos).

Por ello, como ejemplo, el agente puede ser cualquiera de: un $U{:}A_{cAMP}$, un A:AC, un A:VIPr, un $A{:}VIP_n$, un I:I:VIPr o un $I{:}I{:}VIP_n$.

COMBINACION DE $I{:}I_{cAMP}$ Y/O $I{:}M_{cAMP}$ Y/O $U{:}A_{cAMP}$

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede ser una combinación de potenciadores de cAMP. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede ser dos o más de:

$I{:}PDE_{cAMP}$
$I{:}PDEn_{cAMP}$
I:NPY
$I{:}NPY\ Y_n$

PATRICIA ... MORENO
... Y ... MAN
... 113
Teléf. ... MADRID

43

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

## COMBINACION DE MIMETICO DE cAMP e I:$I_{cAMP}$ Y/O I:$M_{cAMP}$ Y/O U:$A_{cAMP}$

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede ser una combinación de un mimético de cAMP y uno o más potenciadores de cAMP. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede ser un mimético de cAMP y uno o más de:

I:$PDE_{cAMP}$

I:$PDEn_{cAMP}$

I:NPY

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

[illegible] MORENO
ING [illegible] AN
[illegible]
Telf. [illegible] MADRID

A:VIP$_n$

I:I:VIPr

I:I:VIP$_n$

INHIBIDOR

El término "inhibidor", como se utiliza en la presente con respecto al agente de la presente invención, significa un agente que puede reducir y/o eliminar y/o enmascarar y/o evitar la acción perjudicial de un I$_{cAMP}$ y/o un M$_{cAMP}$ hacia cAMP. El inhibidor puede actuar como un antagonista.

ACTIVADOR

El término "activador", como se utiliza en la presente con respecto del agente de la presente invención, significa un agente que puede aumentar y/o producir y/o desenmascarar y/o elevar y/o asegurar la acción de cAMP y/o un A$_{cAMP}$. El activador puede actuar como un agonista.

OTROS COMPONENTES ACTIVOS

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede estar en combinación con uno o más de otros compuestos activos, tal como uno o más agentes capaces de potenciar

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 13
Tel: [illegible] - MADRID

cGMP.

## SECUENCIA DE AMINOACIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "proteína".

La secuencia de aminoácidos puede prepararse aislada de una fuente adecuada, o puede prepararse sintéticamente o puede prepararse mediante el uso de técnicas de DNA recombinante.

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de aminoácidos que es capaz de actuar como una diana en un ensayo para la identificación de uno o más agentes y/o derivados de éstos capaces de afectar a la secuencia de aminoácidos con el fin de potenciar el cAMP para tratar FSAD.

## SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de nucleótidos" es sinónimo del término "polinucleótido".

PATRICIA [illegible] MORENO
MADRID
Telf.

46

La secuencia de nucleótidos puede ser DNA o RNA de origen genómico, o sintético o recombinante. La secuencia de nucleótidos puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, representando la cadena con sentido o sin sentido o combinaciones de éstas.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente DNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos está preparada preferiblemente mediante el uso de técnicas de DNA recombinante (por ejemplo DNA recombinante).

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente cDNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos puede ser preferiblemente la misma que la forma de origen natural para este aspecto.

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una sustancia capaz de actuar como una diana en un ensayo (como un ensayo de dos híbridos de levadura) para la identificación de uno o más agentes y/o derivados de éstos capaces de afectar a la

MORENO

sustancia a fin de potenciar el cAMP para tratar FSAD.

VARIANTES/HOMOLOGOS/DERIVADOS

Además de las secuencias de aminoácidos y de las secuencias de nucleótidos específicas mencionadas en la presente, la presente invención comprende también el uso de variantes, homólogos y derivados de éstas. En este caso, el término "homología" puede igualarse a "identidad".

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos un 75, 85 ó 90% idéntica, preferiblemente al menos un 95 ó 98% idéntica. En particular, la homología debería considerarse con respecto a aquellas regiones de la secuencia (como los aminoácidos de las posiciones 51, 56 y 57) conocidas por ser esenciales para una actividad. Aunque la homología puede considerarse también en términos de similitud (es decir residuos de aminoácidos con propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología pueden realizarse manualmente, o más habitualmente, con la ayuda de programas

MORENO
MADRID

de comparación de secuencia disponibles fácilmente. Estos programas de ordenador comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina un alineamiento "sin huecos". Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se realizan sólo sobre un número relativamente pequeño de residuos.

Aunque este es un procedimiento muy simple y consistente, no consigue tener en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o una deleción producirá que los siguientes residuos de aminoácidos estén fuera de la alineación, dando como resultado potencial una gran reducción del % de homología cuando se realiza un alineamiento global. Consiguientemente, la mayoría de los procedimientos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta las posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente la puntuación general de homología. Esto se consigue

MORENO
MADRID

insertando "huecos" en el alineamiento de secuencia para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan "penalizaciones de huecos" a cada hueco que aparece en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una secuencia de aminoácidos con tan pocos huecos como sea posible, lo que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas, conseguirán una mayor puntuación que una con muchos huecos. Los "costes de huecos afines" que se utilizan típicamente, cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco, y una penalización menor por cada residuo posterior al hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más habitualmente utilizado. Las penalizaciones por huecos mayores darán lugar por supuesto a alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se utiliza dicho software para comparaciones de secuencia. Por ejemplo, al utilizar el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase a continuación) la penalización por hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

El cálculo del máximo % de homología requiere por lo tanto primeramente la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa de ordenador adecuado para llevar a vabo dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, EE.UU., Devereux, et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencias incluyen, aunque no están limitados a ellos, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999, ibidem, capítulo 18), FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación GENEWORKS. Ambos BLAST y FASTA están disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel et al., 1999, ibidem, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit.

Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el propio proceso de alineamiento típicamente no está basado en la comparación de pares todo-o-nada. En lugar de eso, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similitud graduada que asigna puntuaciones a cada comparación emparejada basada en la similitud química o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz utilizada habitualmente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el conjunto BLAST de programas. El programa GCG Wisconsin utiliza generalmente los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos habituales si se suministra (véase el manual del usuario para más detalles). Se prefiere utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz por defecto, como BLOSUM62.

Una vez el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software realiza esto típicamente como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

Las secuencias pueden tener también deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una sustancia de funcionalidad equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden realizarse sobre la base de similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicia, hidrofilia, y/o naturaleza anfipática de los residuos siempre y cuando se conserve la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos negativamente cargados incluyen ácido aspártico y ácido glutámico, los aminoácidos positivamente cargados incluyen lisina y arginina, y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados con valores de hidrofilia similar incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Las sustituciones conservativas pueden realizarse, por ejemplo, según la tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna, y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna, pueden sustituirse unos a otros.

| | | |
|---|---|---|
| ALIFATICO | No polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar sin carga | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar cargado | D E |
| | | K R |
| AROMATICO | | H F W Y |

VECTORES DE EXPRESION

La secuencia de nucleótidos para uso como diana o para expresar la diana puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede utilizarse para

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] RID

replicar y expresar la secuencia de nucleótidos en y/o a partir de una célula huésped compatible. La expresión puede controlarse utilizando secuencias de control que incluyen promotores/estimuladores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden utilizarse promotores procarióticos y promotores funcionales en células eucarióticas. Pueden utilizarse promotores específicos de tejido o específicos de estímulo. También pueden utilizarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes descritos anteriormente.

La proteína producida por una célula huésped recombinante mediante expresión de la secuencia de nucleótidos, puede segregarse o puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector utilizados. Las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de la sustancia codificada por las secuencias a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular.

## PROTEINAS DE FUSION

La secuencia de aminoácidos diana puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo como ayuda en la extracción y purificación. Ejemplos de compañeros de proteína de

54

MORENO
MADRID

fusión incluyen glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a DNA y/o activación transcripcional) y β-galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de corte proteolítico entre la secuencia del compañero de la proteína de fusión y la secuencia de proteína de interés para permitir la eliminación de las secuencias de la proteína de fusión. Preferiblemente la proteína de fusión no impedirá la actividad de la diana.

La proteína de fusión puede comprender un antígeno o un determinante antigénico condensado a la sustancia de la presente invención. En esta realización, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de origen no natural que comprende una sustancia que puede actuar como coadyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmune. El antígeno o el determinante antigénico puede estar unido al extremo amino o carboxi de la sustancia.

En otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos puede estar ligada a una secuencia heteróloga que codifica una proteína de fusión. Por ejemplo, para rastrear bibliotecas de péptidos en busca de agentes capaces de influir en la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia quimérica que exprese un

MADRID
Teléf. 519

epitopo heterólogo que es reconocido por un anticuerpo disponible comercialmente.

## ANTICUERPOS

En una realización de la presente invención, el agente de la presente invención puede ser un anticuerpo.

Los anticuerpos pueden producirse por técnicas estándar, tal como por inmunización con la sustancia de la invención o utilizando una biblioteca de muestra de fagos.

Para los fines de esta invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique otra cosa, incluye, aunque no está limitado a ellos, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab. Dichos fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos enteros que conservan su actividad de unión para una sustancia diana, los fragmentos Fv, F(ab') y $F(ab')_2$, así como los anticuerpos de cadena simple (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Además, los anticuerpos y fragmentos de éstos pueden ser anticuerpos humanizados, por ejemplo como se describe en la sustancia A-239400. Los anticuerpos neutralizantes, es decir, aquellos que inhiben la actividad biológica de los polipéptidos de la sustancia, son especialmente preferidos para diagnóstico y terapia.

Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un polipéptido inmunogénico que lleva un(os) epitopo(s) obtenible(s) a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención. Dependiendo de la especie huésped, pueden utilizarse diversos coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos coadyuvantes incluyen, aunque no están limitados a ellos, geles minerales de Freund como hidróxido de aluminio y sustancias activas en superficie como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa de bocallave y dinitrofenol. El BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) y el *Corynebacterium parvum* son coadyuvantes humanos potencialmente útiles que pueden emplearse si el polipéptido de la sustancia purificado se administra a individuos inmunológicamente comprometidos con el fin de estimular la defensa sistémica.

El suero del animal inmunizado se recoge y se trata según procedimientos conocidos. Si el suero que contiene

[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

anticuerpos policlonales hacia un epitopo obtenible a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención contiene anticuerpos hacia otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para producir y procesar los antisueros policlonales son conocidas en la técnica. Para poder preparar dichos anticuerpos, la invención proporciona también polipéptidos de la invención o fragmentos de éstos haptenizados por otro polipéptido para uso como inmunógenos en animales o humanos.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia epitopos obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención pueden producirse fácilmente por un experto en la técnica. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas es bien conocida. Pueden crearse líneas celulares de producción de anticuerpos inmortales por fusión celular, y también por otras técnicas como transformación directa de linfocitos B con DNA oncogénico, o transfección con virus Epstein-Barr. Pueden rastrearse los paneles de anticuerpos monoclonales producidos frente a epitopos de órbita para determinar diversas propiedades, es decir, la afinidad de isotipo y epitopo.

Telf. ... MADRID

Los anticuerpos monoclonales de la sustancia y/o agente identificado de la presente invención pueden prepararse utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, aunque no están limitadas a ella, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Koehler y Millstein (1975 Nature 256:495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., (1983) Immunol. Today 4:72, Cote et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030) y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc., pág. 77-96). Además, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", así como para la separación de genes de anticuerpo de ratón de genes de anticuerpo humanos para obtener una molécula con especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas (Morrison et al. (1984) Prc. Natl, Acad. Sci. 81:6851-6855, Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608, Takeda et al (1985) Nature 314:452-454). Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de Estados Unidos nº 4.946.779) pueden adaptarse para producir los anticuerpos de cadena sencilla específicos de la sustancia.

[illegible] MADRID

Los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, que están dirigidos hacia epitopos obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención son particularmente útiles en diagnóstico, y aquellos que son neutralizantes son útiles en inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales, en particular, pueden utilizarse para excitar anticuerpos anti-idiotipo. Los anticuerpos anti-idiotipo son inmunoglobulinas que llevan una "imagen interna" de la sustancia y/o agente frente al que se desea protección.

Las técnicas para excitar anticuerpos anti-idiotipo son conocidas en la técnica. Estos anticuerpos anti-idiotipo pueden ser útiles también en terapia.

Los anticuerpos pueden producirse también por inducción de la producción in vivo de la población de linfocitos o por rastreo de bibliotecas de inmunoglobulinas recombinantes o paneles de reactivos de unión altamente específicos como se describen en Orlandi et al. (1989, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3822-3837) y Winter, G., y Milstein, C. (1991, Nature, 349:293-299).

También pueden generarse fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específica para la sustancia. Por

MORENO
MADRID
Telé.

ejemplo, dichos fragmentos incluyen, aunque no están limitados a ellos, los fragmentos $F(ab')_2$ que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab que pueden generarse por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Como alternativa, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab para permitir una rápida y sencilla identificación de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse W.D., et al., (1989) Science 256:1275-1281).

SEÑALIZADORES

Puede utilizarse una amplia variedad de señalizadores en los procedimientos de ensayo (así como en los rastreos) de la presente invención, proporcionando los señalizadores preferidos señales convenientemente detectables (por ejemplo por espectroscopía). Como ejemplo, un gen señalizador puede codificar una enzima que cataliza una reacción que altera las propiedades de absorción de luz.

Ejemplos de moléculas señalizadoras incluyen aunque no están limitadas a ellas, β-galactosidasa, invertasa, proteína de fluorescencia verde, luciferasa, cloranfenicol, acetiltransferasa, β-glucuronidasa, exo-glucanasa y

MORENO
RID

glucoamilasa. Como alternativa, pueden incorporarse nucleótidos marcados radiactivamente o marcados fluorescentemente a transcriptos nacientes que se identifican después cuando se unen a las sondas de ligonucleótidos.

En una realización preferida, la producción de la molécula de señalizador se mide por la actividad enzimática del producto del gen señalizador, como la β-galactosidasa.

Se conocen en la técnica una serie de protocolos para detectar y medir la expresión de la diana, tal como utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos de la proteína. Los ejemplos incluyen enzimoinmunoensayo (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas fluorescentes (FACS). Se prefiere un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales de dos sitios, que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos con dos epitopos no interferentes en polipéptidos, pero puede emplearse un ensayo de unión competitiva. Estos y otros ensayos se describen, entre tros lugares, en Hampton R., et al. (1990), Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul MN) y Maddox D.E. e al., (1983 , J. Exp. Med. 15 8:121 1).

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de técnicas de marcaje y conjugación que pueden utilizarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir hibridación marcada a sondas PCR para detectar las secuencias del polinucleótido diana incluyen el marcaje de oligonucleótidos, traducción por muescas, marcaje terminal o amplificación por PCR utilizando un oligonucleótido marcado. Como alternativa, la secuencia de codificación, o cualquier porción de ella, puede clonarse en un vector para la producción de una sonda de mRNA. Dichos vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles y pueden utilizarse para sintetizar sondas de RNA in vitro por adición de una polimerasa de RNA apropiada como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados.

Una serie de compañías como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp. (Cleveland, OH) suministran estuches comerciales y protocolos para estos procedimientos. Las moléculas señalizadoras o marcadores adecuadas incluyen radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que explican el uso de dichos marcadores

MORENO
AN
113
Tel. MADRID

incluyen los documentos US-A-3817837, US-A-3850752, US-A-3939350, US-A-3996345, US-A-4277437, US-A-4275149 y US-A-4366241. Además, las inmunoglobulinas recombinantes pueden producirse como se muestra en el documento US-A-4816567.

Los procedimientos adicionales para cuantificar la expresión de una molécula particular incluyen el marcaje radiactivo (Melby, P.C., et al. 1993, J. Immunol. Methods 159:235-44) o la biotinilación (Duplaa, C.et al., 1993, Anal. Biochem. 229-36) de nucleótidos, la coamplificación de un ácido nucleico control y curvas estándar en las que se interpolan los resultados experimentales. La cuantificación de muestras múltiples puede acelerarse realizando el ensayo en formato ELISA, en el que el oligómero de interés se presenta a varias diluciones y la respuesta espectrofotométrica o calorimétrica proporciona una rápida cuantificación.

Aunque la presencia/ausencia de expresión de un gen marcador sugiere que el gen de interés está también presente, su presencia y su expresión deben confirmarse. Por ejemplo, si la secuencia de nucléotidos se inserta en una secuencia de un gen marcador, las células recombinantes que contienen el mismo pueden identificarse por la ausencia de la función del gen marcador. Como alternativa, un gen

MORENO
MADRID

64

marcador puede colocarse en tándem con una secuencia de codificación diana bajo el control de un promotor simple. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción selección indica habitualmente la expresión de la diana también.

Como alternativa, las células huésped que contienen la secuencia de codificación para la diana y que expresan las regiones de codificación de la diana pueden identificarse mediante una serie de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, aunque no están limitados a ellos, la hibridación DNA-DNA DNA-RNA y la técnica de bioensayo o inmunoensayo de proteínas, que incluyen tecnologías basadas en membrana, basadas en disoluciones o basadas en chips para la detección y/o cuantificación del ácido nucleico o de la proteína.

ENSAYOS GENERALES DE LA ACTIVIDAD/NIVELES DE cAMP

Puede determinarse la capacidad de un agente de ensayo para potenciar el cAMP midiendo un aumento o reducción relevante de un nivel diana. Además, o como alternativa, puede determinarse la capacidad de un agente de ensayo para potenciar el cAMP midiendo un aumento relevante de los

MORENO
AN
113
MADRID

niveles de cAMP. Como ejemplo, pueden adaptarse las explicaciones de Smith et al., 1993 (Appl. Biochem. Biotechol., 41:189-218). Existen también estuches de inmunoensayo disponibles comercialmente para la medida del cAMP (por ejemplo Amersham International, Arlington Heights, IL y DuPont, Boston, MA). Se proporcionan los detalles de un ensayo de cAMP adecuado en la sección experimental.

## RASTREOS

Puede utilizarse cualquiera de una o más dianas adecuadas, como una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos, para identificar un $P_{cAMP}$ en cualquiera de una serie de técnicas de rastreo de medicamentos. La diana empleada en dicho ensayo puede estar libre en disolución, fijada a un soporte sólido, portada sobre una superficie celular o localizada intracelularmente. Puede medirse la anulación de la actividad de la diana o la formación de complejos de unión entre la diana y el agente a ensayar.

Las técnicas de rastreo de medicamentos pueden basarse en el procedimiento descrito en Geysen, solicitud de patente europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. En resumen, se sintetiza un gran número de diferentes

[illegible] MORENO
[illegible]AN
[illegible]RID

compuestos de ensayo peptídicos pequeños sobre un sustrato sólido, como puntas de plástico o alguna otra superficie. Se hacen reaccionar los compuestos peptídicos de ensayo con una diana adecuada o fragmento de ésta y se lavan. Se detectan entonces las entidades unidas, por ejemplo procedimientos de adaptación adecuados bien conocidos en la técnica. También pueden recubrirse directamente con una diana purificada placas para uso en técnicas de rastreo de medicamentos. Como alternativa, pueden utilizarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

Esta invención contempla también el uso de ensayos de rastreo de medicamentos competitivos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a una diana compiten específicamente con un compuesto de ensayo para la unión a la diana.

Otra técnica de rastreo proporciona un rastreo de alto rendimiento (HTS) de agentes con afinidad de unión adecuada hacia las sustancias y está basado en el procedimiento descrito en el documento WO 84/03564.

Se espera que los procedimientos de ensayo de la presente invención sean adecuados para el rastreo tanto a pequeña

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] RID
Telf. [illegible]

como a gran escala de los compuestos de ensayo, así como en ensayos cuantitativos.

De esta manera, la presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian el cAMP, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de cAMP.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian selectivamente el cAMP en genitales sexuales femeninos, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada de los genitales sexuales femeninos con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de cAMP.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian el cAMP, comprendiendo el procedimiento poner en contacto un objetivo adecuado con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles del objetivo.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de identificar agentes que potencian selectivamente el cAMP en genitales sexuales femeninos, comprendiendo el

MORENO
MADRID

procedimiento poner en contacto una diana adecuado de los genitales sexuales femeninos con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles del objetivo.

## DIAGNOSTICOS

La presente invención proporciona también una composición o estuche de diagnóstico para la detección de una predisposición al FSAD. A este respecto, la composición o estuche comprenderá una entidad que es capaz de indicar la presencia de uno o más, o incluso la ausencia de uno o más, de las dianas en una muestra de ensayo. Preferiblemente, la muestra de ensayo se obtiene a partir de genitales sexuales femeninos o de una secreción de éstos.

Como ejemplo, la composición de diagnóstico puede comprender cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente o una variante, homólogo, fragmento o derivado de éstos, o una secuencia capaz de hibridarse con toda o con una parte de cualquiera de las secuencias de nucleótidos.

Para proporcionar una base para el diagnóstico de la enfermedad, deben establecerse valores patrón o valores normales de una diana. Esto pueden conseguirse combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con un anticuerpo hacia una diana, en condiciones adecuadas para la formación de complejos, que son bien conocidas en la técnica. La cantidad de formación de complejo patrón puede cuantificarse por comparación con una serie de diluciones de controles positivos en los que se combina una cantidad conocida de anticuerpo con concentraciones conocidas de una diana purificada. Después, los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por FSAD. La desviación entre los valores patrón y los del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad.

Una diana control, o cualquier parte de ella, puede proporcionar la base para un compuesto de diagnóstico y/o terapéutico. Con fines de diagnóstico, las secuencias de polinucleótidos diana pueden utilizarse para detectar y cuantificar la expresión genética en dolencias, trastornos enfermedades en las que pueda estar implicado el FSAD.

La secuencia de polinucleótidos que codifica la diana puede utilizarse para el diagnóstico del FSAD resultante de la expresión de la diana. Por ejemplo, las secuencias de polinuclétidos que codifican una diana pueden utilizarse

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] RID

70

en ensayos de hibridación o de PCR de tejidos procedentes de biopsias o autopsias o fluidos biológicos, para detectar anormalidades en la expresión de la diana. La forma de dichos procedimientos cuantitativos o cualitativos puede incluir análisis Southern o Northern, transferencia por puntos u otras tecnologías basadas en membrana, tecnologías PCR, varillas de sondeo, tecnologías de puntas o chips, y ELISA u otras tecnologías de formato de múltiples muestras. Todas estas técnicas son bien conocidas en la técnica y son de hecho la base de muchos estuches de diagnóstico comercialmente disponibles.

Dichos ensayos pueden ajustarse para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico particular y pueden utilizarse en estudios animales, en ensayos clínicos o para monitorizar el tratamiento de un paciente individual. Para proporcionar una base para el diagnóstico de una enfermedad debe establecerse un perfil normal o patrón para la expresión de la diana. Esto se consigue combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con la diana o una porción de ésta, en condiciones adecuadas para la hibridación o amplificación. La hibridación patrón puede cuantificarse por comparación de los valores obtenidos de sujetos normales con una serie de diluciones de controles

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible]
MADRID
Teléf. [illegible]

positivos ensayados en el mismo experimento, en que se utiliza una cantidad conocida de diana purificada. Los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por un trastorno o enfermedad relacionado con la expresión de la secuencia de codificación de la diana. La desviación entre los valores patrón y los del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad. Si se establece la enfermedad, se administra un agente terapéutico existente y pueden generarse valores o perfiles de tratamiento. Finalmente, puede repetirse el ensayo regularmente para evaluar si los valores se alejan se acercan al esquema normal o patrón. Los perfiles de tratamiento sucesivos pueden utilizarse para mostrar la eficacia del tratamiento durante un periodo de varios días o varios meses.

De esta manera, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido diana o una variante, homólogo, fragmento o derivado de éste, para producir anticuerpos anti-diana que pueden, por ejemplo, utilizarse como diagnóstico para detectar y cuantificar los niveles de diana en estados de los FSAD.

La presente invención proporciona también ensayos y

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible]
A.DRID

72

estuches de diagnóstico para la detección de una diana en células y tejidos, que comprenden una diana purificada que puede utilizarse como control positivo, y anticuerpos anti-diana. Dichos anticuerpos pueden utilizarse en tecnologías basadas en disoluciones, basadas en membrana o basadas en tejidos para detectar cualquier estado de enfermedad o dolencia relacionado con la expresión de la proteína diana con la expresión de las deleciones o de una variante, homólogo, fragmento o derivado de éste.

SONDAS

Otro aspecto de la invención en cuestión es la provisión de sondas de hibridación de ácidos nucleicos o de PCR que son capaces de detectar secuencias de polinucleótidos, incluyendo secuencias genómicas, que codifican una región de codificación de la diana o moléculas estrechamente relacionadas, como alelos. La especificidad del la sonda, es decir, si deriva de una región o dominio altamente conservado, conservado o no conservado, y el rigor de la hibridación o amplificación (alto, intermedio, bajo) determinarán si la sonda identifica sólo las secuencias de codificación de la sonda de origen natural, o secuencias relacionadas. Las sondas de detección de secuencias de ácidos nucleicos relacionados se seleccionan de regiones

PATRICIA [illegible] MORENO
ING [illegible] AN
c. [illegible] 113
Teléf. [illegible] MADRID

de nucléotidos conservadas o altamente conservadas de los miembros de la familia de la diana y dichas sondas pueden utilizarse en un conjunto de sondas degeneradas. Para la detección de secuencias de ácidos nucleicos idénticas, o cuando se desea una máxima especificidad, las sondas de ácidos nucleicos se seleccionan de regiones de nucleótidos no conservadas o regiones únicas de los polinucleótidos diana. Como se utiliza en la presente, el término "región de nucleótidos no conservada" se refiere a un región de nucleótisos que es única en una secuencia de codificación de objetivo descrita en la presente y que no aparece en miembros de la familia relacionados.

La PCR, como se describe en los documentos US-A-4683195, US-A-4800195 y US-A-4965188, proporciona usos adicionales para los oligonucleótidos basados en secuencias diana. Dichos oligonucleótidos generalmente se sintetizan químicamente, pero pueden generarse enzimáticamente o producirse a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros comprenden generalmente dos secuencias de nucleótidos, una de orientación con sentido (5'->3') y otra de orientación sin sentido (3'->5') empleadas en condiciones optimizadas para la identificación de un gen o estado específico. Estos dos mismos oligómeros, conjuntos encajados de oligómeros, o incluso un conjunto degenerado

MADRID

de oligómeros, pueden emplearse en condiciones menos rigurosas para la detección y/o cuantificación de secuencias de DNA o RNA estrechamente relacionadas.

La secuencia de ácidos nucleicos para una diana puede utilizarse también para generar sondas de hibridación, como se ha descrito anteriormente, para mapear la secuencia genómica endógena. La secuencia puede mapearse en un cromosoma particular o en una región específica del cromosoma utilizando técnicas bien conocidas. Estas incluyen hibridación in situ para dispersiones cromosómicas (Verma et al. (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York City), preparaciones cromosómicas con clasificación de flujo o construcciones de cromosomas artificiales como YAC, cromosomas bacterianos artificiales (BAC), construcciones bacterianas PI o bibliotecas de cDNA de cromosomas simples.

La hibridación in situ de preparaciones cromosómicas y las técnicas de mapeo físico, como el análisis de ligamiento utilizando marcadores cromosómicos establecidos, son inestimables en la extensión de los mapas genéticos. Pueden encontrarse ejemplos de mapas genéticos en Science (1995, 270:410 y siguientes y 1994, 265:1981 y siguientes). A menudo, la posición de un gen en un cromosoma de otra

AN
113
MADRID

especie de mamífero puede revelar marcadores asociados incluso si el número o el brazo de un cromosoma humano particular no es conocido. Pueden asignarse nuevas secuencias a los brazos cromosómicos, o a partes de éstos, por mapeo físico. Esto proporciona información valiosa a los investigadores que buscan los genes de las enfermedades utilizando clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Una vez se ha localizado aproximadamente una enfermedad o síndrome por ligamiento genético a una región genómica particular, cualquier mapeo de secuencias de ese área puede representar genes asociados o reguladores para investigaciones posteriores. La secuencia de nucleótidos objeto de la invención puede utilizarse también para detectar diferencias en la localización cromosómica debida a translocación, inversión, etc., entre individuos normales, portadores o afectados.

## CELULAS HUESPED

El término "célula huésped" en relación con la presente invención incluye cualquier célula que podría comprender la diana del agente de la presente invención.

De esta manera, otra realización de la presente invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas

[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

con un polinucleótido que es o que expresa la diana de la presente invención. Preferiblemente, el citado polinucleótido se lleva en un vector de replicación y expresión de los polinucleótidos que son la diana o que expresan la diana. Las células se elegirán para que sean compatibles con el citado vector y pueden ser por ejemplo células procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levadura o de plantas.

La bacteria gram-negativa *E. coli* se utiliza ampliamente como huésped para la expresión de genes heterólogos. Sin embargo, tienden a acumularse grandes cantidades de proteína heteróloga dentro de la célula. La purificación posterior de la proteína deseada de las proteínas intracelulares de *E. coli* en bruto puede ser difícil a veces.

En contraposición con *E. coli*, las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como huéspedes heterólogos por su capacidad de segregar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como huéspedes son las de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención, y/o del

..AN
113
..ADRID
Telf.

deseo de un procesamiento posterior de la proteína expresada, pueden preferirse huéspedes eucarióticos como levaduras u otros hongos. En general, se prefieren las células de levadura frente a las células fúngicas porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas las segregan mal las células de levadura, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo hiperglicosilación en levadura). En estos casos, debe seleccionarse un organismo huésped fúngico diferente.

Ejemplos de huéspedes de expresión adecuados dentro del alcance de la presente invención son hongos como la especie *Aspergillus* (como las descritas en el documento EP-A-0184438 y EP-A-0284603) y especie *Trichoderma*, bacterias como la especie *Bacillus* (como las descritas en los documentos EP-A-0134048 y EP-A-0253455), la especie *Streptomyces* y especie *Pseudomonas* y levaduras como la especie *Kluyveromyces* (como las descritas en los documentos EP-A-0096430 y EP-A-0301670) y la especie *Saccharomyces*. Como ejemplo, los huéspedes de expresión típicos pueden seleccionarse de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* var. *tubigensis*, *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus orvzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces*

[illegible]
[illegible] n°, 113
Teléf. [illegible] - MADRID

*lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

El uso de células huésped adecuadas, como células huésped de levaduras, hongos y plantas, puede proporcionar modificaciones post-transcripcionales (por ejemplo miristoilación, glicosilación, truncado, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) como puede ser necesario para conferir una actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinante de la presente invención.

ORGANISMO

El término "organismo" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que podría comprender la diana según la presente invención y/o productos obtenidos de ésta. Los ejemplos de organismos pueden incluir un hongo, levadura o planta.

El término "organismo transgénico" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprende la diana según la presente invención y/o los productos obtenidos.

## TRANSFORMACION DE CELULAS HUESPED/ORGANISMOS HUESPED

Como se indicó anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las explicaciones sobre la transformación de huéspedes procarióticos está bien documentada en la técnica, por ejemplo véase Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

Si se utiliza un huésped procariótico, puede ser necesario modificar la secuencia de nucleótidos antes de la transformación, tal como por eliminación de intrones.

En otra realización, el organismo transgénico puede ser una levadura. A este respecto, las levaduras también se han utilizado ampliamente como vehículo para la expresión de genes heterólogos. La especie *Saccharomyces cerevisiae* tiene una larga historia de uso industrial, incluyendo su uso para la expresión de genes heterólogos. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido revisada por Goodey et al (1987, Yeast Biotechnology, D.R.

MADRID

Berry et al., eds., pág. 401-429, Allen y Unwin, Londres) y por King, et al. (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E.F. Walton y G.T. Yarronton, eds., pág. 107-133, Blackie, Glasgow).

Por varias razones, *Saccharomyces cerevisiae* es adecuada para la expresión de genes heterólogos. En primer lugar, no es patogénica para humanos y es incapaz de producir ciertas endotoxinas. En segundo lugar, tiene una larga historia de uso seguro durante siglos de explotación comercial con varios fines. Esto ha llevado a una amplia aceptación del público. En tercer lugar, el uso comercial e investigación dedicadas al organismo ha dado como resultado una riqueza de conocimientos sobre su genética y fisiología así como sobre las características de fermentación a gran escala de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se proporciona una revisión de los principios de la expresión de genes heterólogos en Sacccharomyces cerevisiae y de la secreción de productos genéticos en H. Hinchcliffe, E. Kenny (1993, "Yeast as a vehicule for the expression of heterologous genes", Yeasts, vol 5, Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, eds., 2ª edición, Academic Press Ltd.).

Están disponibles varios tipos de vectores de levaduras,

Teléf. MADRID

81

incluyendo vectores integradores, que necesitan la recombinación con el genoma del huésped para su mantenimiento y la replicación autónoma en vectores plásmidos.

Para preparar Saccharomyces transgénica, se preparan las construcciones de expresión por inserción de la secuencia de nucleótidos de la presente invención en una construcción diseñada para la expresión en levadura. Se han desarrollado varios tipos de construcciones utilizadas para la expresión heteróloga. Las construcciones contienen un promotor activo en levadura fusionado con la secuencia de nucleótidos de la presente invención, habitualmente se utiliza un promotor de origen de levadura, como el promotor GAL1. Habitualmente se utiliza una secuencia señal proveniente de levadura, como la secuencia que codifica el péptido señal SUC2. Un terminador activo de levadura termina el sistema de expresión.

Para la transformación de levaduras se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, puede prepararse una Saccharomyces transgénica según la presente invención siguiendo las expliaciones de Hinnen et al. (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929), Beggs, J.D. (1978, Nature, Londres, 275,

104) e Ito, H. et al. (1983, J. Bacteriology 153, 163-168).

Las células de levadura transformadas se seleccionan utilizando diversos marcadores selectivos. Entre los marcadores utilizados para la transformación existe una serie de marcadores auxotróficos como LEU2, HIS4 y TRP1, y marcadores de resistencia a antibióticos dominantes como marcadores del antibiótico aminoglicósido, por ejemplo G418.

Otro organismo huésped es una planta. El principio básico en la construcción de plantas genéticamente modificadas es insertar información genética en el genoma de la planta de modo que se obtenga un mantenimiento estable del material genético insertado. Existen algunas técnicas para la inserción de información genética, siendo las dos principales la introducción directa de la información genética y la introducción de la información genetica mediante el uso de un sistema de vector. Puede encontrarse una revisión de las técnicas generales en los artículos de Potrykus (Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech Marzo/abril 1994 17-27). Pueden encontrarse otras explicaciones sobre transformación de plantas en el documento EP-A-0449375.

PATRICIA MORENO

De esta manera, la presente invención proporciona también un procedimiento de transformación de una célula huésped con una secuencia de nucleótidos que debe ser la diana o que debe expresar la diana. Las células huésped transformadas con la secuencia de nucleótidos pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede segregarse o puede contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector utilizado. Como comprenderán los expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirijan las secreción de las secuencias de codificación a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular. Otras construcciones recombinantes pueden unir la secuencia de codificación a la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de las proteínas solubles (Kroll D.J. et al, (1993), DNA Cell. Biol. 12:441-53).

## COMPOSICIONES FARMACEUTICAS

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] RID

eficaz del agente de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo combinaciones de éstos).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano animal en medicina humana y veterinaria y comprenderá típicamente uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos o diluyentes para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen en, por ejemplo Pharmaceutical Sciences de Remington, Maçk Publishing Co. (A.R. Gennaro edit., 1985). La selección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede hacerse con respecto a la vía prevista de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmaceúticas pueden comprender como vehículo, excipiente o diluyente, o además de los mismos, cualquier ligante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento o agente(s) de solubilización.

Pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, tintes y agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido para-hidroxibenzoico. También pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión.

ADRID

Puede haber diferentes requerimientos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de suministro. Como ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para suministrarse utilizando una minibomba o por vía mucosa, por ejemplo en forma de un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o disolución ingerible, o parenteralmente, en la que la composición se formula en una forma inyectable para suministro, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Como alternativa, la formulación puede diseñarse para ser suministrada por ambas vías.

Cuando el agente se va a suministrar por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debería ser capaz de permancer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal, por ejemplo debería ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detersivos de la bilis.

Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inhalación, en forma de supositorio o de pesario, tópicamente en forma de una loción, disolución, crema, ungüento o polvo, utilizando un parche dérmico, oralmente en forma de comprimidos que

RENO
AN
NO
13
ADRID
Telf.

contienen excipientes como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, disoluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse preferiblemente en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o monosacáridos suficientes para hacer la disolución isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas que pueden formularse de manera convencional.

Preferiblemente, el agente está en una forma que es adecuada para suministro oral.

ADMINISTRACION

Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, peso, y respuesta del paciente particular. Las dosificaciones a continuación son ilustrativas del caso medio. Puede haber casos, por supuesto, en que sean

MORENO
13
MADRID

necesarios intervalos de dosificación mayores o menores.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por inyección directa. La composición puede formularse para administración parenteral, mucosa, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular o transdérmica. Dependiendo de la necesidad, el agente puede administrarse a una dosis desde 0,01 a 30 mg/kg de peso corporal, tal como de 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

El término "administrado" incluye el suministro por técnicas víricas o no víricas. Los mecanismos de suministro vírico incluyen, aunque no están limitados a ellos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores víricos de herpes, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos y vectores baculovíricos. Los mecanismos de suministro no vírico incluyen transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, compuestos anfifílicos faciales catiónicos (CFA) y combinaciones de éstos. Las vías para dichos mecanismos de suministro incluyen, pero no están limitadas a, vías mucosa, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, tópica o sublingual.

[illegible] MORENO
[illegible] AN
ING [illegible] 13
C [illegible] MADRID
Telef. [illegible]

El término "administrado" incluye, aunque no está limitado a ellos, suministro por vía mucosa, por ejemplo en forma de un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o en forma de una disolución ingerible, por vía parenteral en la que el suministro es por medio de una forma inyectable, como por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.

Para algunas aplicaciones se agente se administra preferiblemente de forma oral.

Para algunas aplicaciones se agente se administra preferiblemente de forma tópica.

MODELOS DE ENSAYO ANIMAL

Pueden utilizarse modelos in vivo para investigar y/o diseñar terapias o agentes terapéuticos para tratar FSAD. Los modelos podrían utilizarse para investigar el efecto de diversas herramientas/compuestos líder sobre una serie de parámetros que indican la respuesta de excitación sexual.

Existe una serie de modelos animales para la disfunción sexual femenina vasculogénica (FSAD) disponibles que pueden

PATENTES [illegible] MORENO
...AN
113
MADRID
Telef.

utilizarse.

Como ejemplo, puede hacerse referencia a modelos animales invasivos (por ejemplo véase Park et al., 1997). En este caso, las respuestas hemodinámicas vaginal y clitorídea pueden registrarse directamente a continuación de la estimulación del nervio pélvico en conejos hembras normales y ateroscleróticos (un modelo validado de los FSAD). Los efectos in vivo de los potenciadores de cAMP, tales como agentes vasodilatadores como antagonistas NPY o agonistas VIP, pueden investigarse en animales normales o con FSAD.

C mo otro ejemplo, puede hacerse referencia a modelos animales no invasivos (por ejemplo véase la revisión de Goldstein et al., 1998, Laan et al., 1998). En este caso, la ultrasonografía de onda Doppler por pulsos proporciona el medio para detectar los cambios de flujo sanguíneo en las arterias vaginal y clitorídea. Este modelo puede utilizarse para investigar los efectos vasculogénicos durante la administración de vasodilatadores.

Otras técnicas no invasivas que pueden utilizarse incluyen fotopletismografía vaginal, que proporciona una medida cuantitativa de la congestión de la mucosa vaginal, y técnicas de compensación térmica vaginal, que están basadas

PATRICIA ... MORENO
ING...
... MADRID
Telf.

en el principio de que los cambios en el flujo sanguíneo vaginal pueden registrarse midiendo la transferencia de calor de una sonda intravaginal mantenida a temperatura constante.

En un aspecto preferido, se utiliza un modelo no invasivo de los FSAD.

UN MODELO ANIMAL DE EXCITACION SEXUAL

En los estudios de los presentes autores, se ha desarrollado un modelo reproducible y robusto de la fisiología de la excitación sexual. Este modelo utiliza un conejo anestesiado y emplea tecnologías de láser Doppler para monitorizar el flujo sanguíneo genital registrando rutinariamente los parámetros cardiovasculares. Se pueden medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo vaginal inducido por la estimulación del nervio pélvico o por infusión de VIP en ausencia y en presencia de los agentes de ensayo.

Se cree que dicho modelo animal refleja directamente los datos clínicos. Por ello, este modelo puede utilizarse para estudiar agentes candidatos para el tratamiento de los FSAD, midiendo la estimulación del flujo sanguíneo vaginal.

PATRICIA [illegible] MORENO
ING... [illegible] AN
[illegible] 113
C. [illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

## MEDIDA FISIOLOGICA DE LA EXCITACION SEXUAL FEMENINA

Según la presente invención, pueden utilizarse una serie de técnicas diferentes para medir el flujo sanguíneo clitorídeo y vaginal. Como ejemplo, puede hacerse uso de fotopletismografía vaginal, técnica de eliminación del calor vaginal, MRI vaginal y clitorídeo de contraste mejorado, imágenes clitorídeas/vulvares por pulsos de láser Doppler y ultrasonografía clitorídea.

La cuantificación de la lubricación vaginal puede medirse también por técnicas conocidas en la técnica, como (a) pesado pre- y post-estimulación de tampones vaginales, y (b) medida del pH del fluido vaginal. Con respecto al último aspecto, el medio ácido normal en reposo en la vagina se hace más alcalino al acercarse al pH de la sangre cuando aparece la trasudación de fluido durante la estimulación sexual.

## PDE (fosfodiesterasa)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es una PDE (fosfodiesterasa).

Se sabe que los nucleótidos cíclicos, como cAMP y cGMP, son

[illegible] MORENO [illegible] AN [illegible] DRID

importantes segundos mensajeros intracelulares. Las nucleótidos cíclicos fosfodiesterasas, también conocidas como PDE, son una familia de enzimas que catalizan la degradación de nucleótidos cíclicos y, al hacerlo, son uno de los componentes celulares que regulan la concentración de nucleótidos cíclicos.

En años recientes, se han definido al menos siete enzimas PDE (como PDEI - PDEVII), así como muchos subtipos de estas enzimas, basándose en la afinidad de sustrato y los requerimientos de cofactores (Beavo, J.A. y Reifsnyder, D.H., Trends Pharmacol. Sci. 11:150 (1990), Beavo, J., en: Cyclic Nucleotides Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action, Beavo, J. y Housley, M.D. (Eds.) Wiley:Chichester, pág. 3-15 (1990).

Ejemplos de PDE incluyen: PDEI que es una PDE dependiente de Ca$^{2+}$/calmodulina, PDEII que es una PDE estimulada por cAMP y cGMP, PDEIII que es una PDE inhibida por cGMP, PDEIV que es una PDE de alta afinidad específica de cAMP y PDEV que es una PDE específica de cGMP. Las PDEI y restantes se denominan a veces PDE de tipo I, y restantes o PDE de tipo 1, y restantes.

Cada familia de PDE puede contener dos o más isoformas (es

[illegible] MORENO
[illegible]AN
[illegible]3
[illegible] ADRID

decir puede haber dos o más isoenzimas PDE). Como ejemplo, la PDEIV de mamífero, la homóloga del gen Dunce de *Drosophila* (Chen, C.N. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (EE.UU.) 83:9313 (1986)) se sabe que tiene cuatro isoformas en rata (Swinnen J.V., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (EE.UU.) 86:5325 (1989)). Se sabe también que las PDE humanas aparecen como isoformas y que tienen variantes de corte y empalme. Por ejemplo, se informó de la clonación de una isoforma humana de PDEIV de monocitos en 1990 (Livi G.P. et al., Mol. Cell. Bio., 10:2678 [1990]). Como otro ejemplo, otros investigadores han clonado independientemente tres variantes de corte y empalme de PDEIV, que se designan ahora como hPDEIV-B1, hPDEIV-B2 y hPDEIV-B3.

Las explicaciones sobre nucleótido cíclico fosfodiesterasas pueden encontrarse también en los documentos US-A-5932423 y US-A-5932465.

Las explicaciones sobre otras nucelótido cíclico fosfodiesterasas, es decir CN PCDE8, pueden encontrarse en el documento WO-A-97/35989. Según el documento WO-A-97/35989, la CN PCDE8 tiene dos isoenzimas, que se designaron CN PCDE8A y CN PCDE8B. El término "isoenzima" se refiere a veces en la técnica como "isoforma".

MADRID

Según el documento WO-A-97/35989, se han identificado muchos inhibidores de diferentes PDE y algunos han experimentado evaluación clínica. Por ejemplo, los inhibidores de PDEIII se están desarrollando como agentes antitrombóticos, como agentes antihipertensivos y como agentes cardiotónicos útiles en el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva. Se ha utilizado rolipram, un inhibidor de PDEIII, en el tratamiento de la depresión y otros inhibidores de PDEIII están sometidos a evaluación como agentes antiinflamatorios. Se ha mostrado que el rolipram inhibe la TNF-alfa inducida por lipopolisacárido (LPS), que se ha mostrado que estimula la replicación de VIH-1 in vitro. Por lo tanto, el rolipram puede inhibir la replicación de VIH-1 (Angel et al., 1995, AIDS 9:1137-44). Además, basándose en su capacidad para suprimir la producción de TNF alfa y beta y del interferón gamma, el rolipram se ha mostrado eficaz en el tratamiento de encefalomielitis, el modelo animal experimental de esclerosis múltiple (Sommer et al., 1995, Nat. Med. 1:244-248) y puede ser eficaz en el tratamiento de disquinesia tardía (Sasaki et al., 1995, Eur. J. Pharmacol. 282:71-76).

Según el documento WO-A-97/35989, existen también inhibidores de PDE no específicos, como teofilina, utilizada en el tratamiento del asma bronquial y otras

[illegible] ADRID
Telé. [illegible]

enfermedades respiratorias, y pentoxifilina, utilizada en el tratamiento de claudicación intermitente y enfermedades vasculares periféricas inducidas por la diabetes. La teofilina se cree que actúa sobre la función del músculo liso de las vías aéreas así como en una capacidad antiinflamatoria o inmunomodulatoria en el tratamiento de enfermedades respiratorias (Banner et al, 1995, Respir. J. 8:996-1000) donde se cree que actúa inhibiendo la hidrólisis tanto de cAMP CN PDE como de cGMP (Banner et al., 1995, Monaldi Arch. Chest. Dis. 50:286-292). La pentoxifilina, también conocida por bloquear la producción de TNF-alfa, puede inhibir la replicación de VIH-1 (Angel et al, supra). Se da una lista de inhibidores de CN PDE en Beavo, 1995, supra.

Se ha sugerido que los inhibidores selectivos de PDE, además de sus isoenzimas y sus isotipos, conducirán a una terapia más eficaz con menos efectos secundarios. Por ejemplo, véanse las explicaciones de las revisiones de Wieshaar R.E., et al., (J. Med. Chem., 28:537[1985]), Giembycz M.A., (Biochem. Pharm., 43:2041 [1992]) y Lowe J.A. y Cheng J.B. (Drugs of the Future, 17:799-807 [1992]).

De esta manera, para algunas aplicaciones es deseable tener una inhibición selectiva de un tipo individual de PDE.

96

Las explicaciones de los antecedentes sobre las PDE han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a PDE2 o PDE estimulada por cGMP se ha extraído de esa fuente.

"Los nucleótidos cíclicos funcionan como segundos mensajeros que median una serie de respuestas celulares ante señales extracelulares como hormonas, luz y neurotransmisores. Las nucleótido cíclico fosfodiesterasas (PDE) juegan un papel en la transducción de la señal por regulación de las concentraciones celulares de los nucleótidos cíclicos. Las células de mamíferos contienen múltiples PDE que se distinguen en al menos 7 familias basadas en su afinidad de sustrato y en su sensibilidad selectiva hacia cofactores y medicamentos inhibidores. Estas familias son: (I) PDE dependientes de $Ca^{2+}$/calmodulina, (II) PDE estimuladas por cGMP, (III) PDE inhibidas por cGMP, (IV) PDE específicas de cAMP, (V) PDE específicas de cGMP, (VI) PDE fotoreceptoras y (VII) PDE de alta afinidad específicas de cAMP. A partir de la secuencia de aminoácidos, es evidente que todas estas familias de PDE contienen un dominio relacionado, que se piensa

...ADRID
Teléf.

que es el dominio catalítico, con aproximadamente un 30% de identidad de secuencia entre las familias. Los miembros de la misma familia están relacionados más estrechamente, comparten el 60-80% de la identidad de secuencia a lo largo de toda la región de codificación.

Michaeli et al. (1993) establecieron un rastreo funcional altamente sensible para el aislamiento de cDNA que codifica cAMP fosfodiesterasas por complementación de los defectos en la cepa Saccharomyces cerevisiae que carece de ambos genes de cAMP PDE endógenos, PDE1 y PDE2. Se aislaron tres grupos de cDNA correspondientes a 3 genes humanos distintos que codificaban PDE específicas de cAMP a partir de una biblioteca de cDNA de glioblastoma humano utilizando este rastreo funcional. Dos de los genes estaban estrechamente relacionados con la PDE específica de cAMP "dunce" de Drosophila. El tercer gen, al que Michaeli et al. (1993) se refirieron como HCP1, codificaba una nueva PDE específica de cAMP. El HCP1 tenía una secuencia de aminoácidos relacionada con las secuencias de los dominios catalíticos de todas las nucleótido cíclico PDE. Es una PDE de alta afinidad específica de cAMP que no comparte otras propiedades de la familia de PDE específicas de cAMP,

PAT. MORENO
ADRID
Telé

sin embargo. La actividad PDE de HCP1 no era sensible a cGMP u otros inhibidores de las PDE inhibibles por cGMP. Las propiedades bioquímicas y farmacológicas de HCP1 sugirieron a Michaeli et al. (1993) que era un miembro de una familia de nucleótido ciclico PDE no descubierta anteriormente, que se designó como la familia VII. Los análisis de transferencia Northern indicaron la presencia de altos niveles de RNA de HCP1 en músculo esquelético humano.

Por análisis de transferencia Southern de líneas celulares híbridas, Milatovich et al. (1994) mapearon el locus de HCP1 en el cromosoma 8, por estudio de las líneas celulares híbridas somáticas que contenían diferentes regiones del cromosoma 8, regionalizaron la asignación de 8q13-q22. Han et al. (1998) mapearon el gen PDE7A en 8q13 mediante fluorescencia de hibridación in situ. Por análisis retrocruzado interespecífico, mapearon el gen Pde7A de ratón en la región proximal del cromosoma 3."

Las explicaciones de los antecedentes sobre PDE2 han sido presentadas por Jennifer P. Macke et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a PDE2 estimulada por cGMP se ha extraido de esa fuente.

"Rosman et al. (1997) clonaron un cDNA correspondiente a PDE2A humana. El gen de PDE2A codifica un polipéptido de 941 aminoácidos con una masa molecular prevista de 106 kD. La secuencia de proteína es un 90% idéntica a las secuencias de PDE2A bovina y de rata. El análisis de transferencia Northern mostró que el PDE2A se expresaba como un mRNA de 4,2 kb a niveles variables en todos los tejidos humanos ensayados, con la gran excepción del cerebro. Los estudios de expresión revelaron que la PDE2A hidroliza cAMP y cGMP y es inhibida por el inhibidor EHNA específico de PDE2A."

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de las PDE están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En un aspecto, la diana de PDE se selecciona de una o más de las siguientes enzimas PDE: $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 1, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 2, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 3, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 4, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 7 y $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 8.

En un aspecto más preferido, la diana de PDE se selecciona de una o más de las siguientes enzimas PDE: $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 1, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 2, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 3 y $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 4.

Preferiblemente, para la presente invención, la PDE para la diana es al menos PDE2.

NEP (endopeptidasa neutra)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es NEP.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de NEP están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En un aspecto, NEP es NEP (EC 3.4.24.11) (también conocida como encefalinasa o endopeptidasa-2). En este caso, se han encontrado mRNA de NEP EC 3.4.24.11 y proteína expresada en vagina humana y de conejo.

En este caso, creemos que en las hembras, incluyendo las que sufren FSAD, se degrada el VIP por la NEP EC3.4.24.11. De esta manera, los inhibidores de NEP potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del VIP liberado durante la excitación. Esto conducirá a un tratamiento de los FSAD, tal como por medio de un aumento de la congestión vaginal. Se ha mostrado que los inhibidores selectivos de NEP EC

PATRICIA MORENO
ING
MADRID
Telef.

3.4.24.11 estimulan los aumentos del flujo sanguíneo genital vaginal estimulado por el nervio pélvico e inducidos por VIP. Además, esos inhibidores selectivos de NEP estimulan la relajación mediada por VIP y por los nervios de la pared vaginal aislada.

Las explicaciones de los antecedentes de NEP han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a NEP se ha extraído de esa fuente.

> "El antígeno de la leucemia linfocítica aguda común es un marcador de superficie celular importante en el diagnóstico de la leucemia linfocítica aguda humana (ALL). Está presente en células leucémicas de fenotipo pre-B, que representan el 85% de los casos de ALL. La CALLA no está restringido sin embargo a las células leucémicas, y se encuentra en una serie de tejidos normales. La CALLA es una glicoproteína que es particularmente abundante en riñón, donde se presenta en el borde de cepillo de los túbulos proximales y en el epitelio glomerular. Letarte et el. (1988) clonaron un cDNA que codificaba CALLA y mostraron que la secuencia de aminoácidos deducida de

MORENO
MADRID

la secuencia de cDNA es idéntica a la de la endopeptidasa neutra humana asociada a membrana (NEP, EC 3.4.24.11), también conocida como encefalinasa. La NEP corta los péptidos en el extremo amino de los residuos hidrofóbicos e inactiva diversas hormonas peptídicas, incluyendo glucagón, encefalina, sustancia P, neurotensina, oxitocina y bradiquinina. Por análisis de transfección de cDNA, Shipp et al. (1989) confirmaron que CALLA es una endopeptidasa neutra funcional del tipo denominado anteriormente encefalinasa. Barker et al. (1989) demostraron que el gen CALLA, que codifica una glicoproteína transmembrana de tipo II de 100 kD, existe en una sola copia de más de 45 kD que no está reordenada como CALLA de superficie celular que expresa malignidades. Se localizó el gen en el cromosoma humano 3 por estudio de los híbridos celulares somáticos e hibridación in situ regionalizada en la localización 3q21-q27. Tran-Paterson et al. (1989) asignaron también el gen al cromosoma 3 por análisis de transferencia Southern de DNA de híbridos celulares somáticos humano-roedor. D'Adamio et al. (1989) demostraron que el gen CALLA abarca más de 80 kb y está compuesto por 24 exones".

NPY (neuropéptido Y)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es NPY o uno de sus receptores asociados.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de NPY y sus receptores están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En este caso, se ha encontrado que el neuropéptido Y (NPY) ejerce una influencia reguladora inhibidora sobre la vasorrelajación mediada por el péptido intestinal vasoactivo (VIP). De esta manera, la inhibición de los receptores NPY dará como resultado un aumento del flujo sanguíneo vaginal mediado por el VIP y el nervio pélvico, es decir, anular las barreras a la vasorrelajación. Clínicamente, esto conducirá a un aumento de la congestión vaginal que conducirá en último término a un aumento de la lubricación a través de trasudación de plasma y a un aumento de la flexibilidad vaginal. Por ello, una diana adecuada para el tratamiento de los FSAD es NPY o uno de sus receptores asociados.

Así, en un aspecto preferido, el agente es un antagonista de NPY $Y_1$, $Y_2$ o $Y_5$, preferiblemente un antagonista oral de NPY $Y_1$, $Y_2$ o $Y_5$. Este agente tratará el FSAD aumentando el flujo sanguíneo vaginal y aumentando la lubricación.

El antagonismo mediado por NPY de los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo representa, por lo tanto, una diana terapéutica potencial mediante la cual el flujo sanguíneo en el tracto genital femenino puede ser influenciado. El mecanismo a través del cual aparece este antagonismo es muy probablemente a través de activación $G_{i/o}$ inducida por el receptor NPY $Y_1$. En otros sistemas fisiológicos, los receptores NPY $Y_1$ han sido implicados en la mediación de la vasoconstricción y en la inhibición de la liberación de transmisores simpáticos (Lundberg et al., 1996, no puede excluirse un efecto de NPY $Y_2$). Se cree que el NPY inhibe la vasorrelajación en el tracto genital femenino mediante la inhibición directa de la adenilato ciclasa que inhibe directamente la liberación de VIP o la neurotransmisión simpática.

Como se ha indicado, un objetivo $P_{cAMP}$ es uno de los receptores NPY.

La liberación neuronal de NPY regula la vasorrelajación inducida por VIP del lecho vascular vaginal. Esto ocurre

PATRICIA ... MORENO
... MADRID

muy probablemente a través de un mecanismo presináptico que implica a los receptores NPY $Y_1$, aunque no puede excluirse un modo de acción post-sináptico. Un antagonista de NPY potenciará la vasodilatación inducida por VIP del lecho vascular vaginal. Clinicamente, esto conducirá a un aumento de la lubricación y de la flexibilidad vaginal a través de la congestión de la pared vaginal.

Los estudios de expresión del receptor NPY realizados por los presente autores han identificado los subtipos de receptor NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$ dentro de la vagina humana.

Por ello, en un aspecto, la diana $P_{cAMP}$ es uno o más de los subtipos de receptores NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$.

Las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a NPY se ha extraído de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY) es un péptido abundante y ampliamente extendido en el sistema nervioso de los mamíferos. Muestra homología de secuencia con el

PATRICIA ... MORENO
... MADRID
Telf. 51...

péptido YY y por encima del 50% de homología en la secuencia de aminoácidos y en la secuencia de nucleótidos con el polipéptido pancreático (PNP, 167780). El NPY es un péptido de 36 aminoácidos. Minth et al. (1984) clonaron el gen de NPY partiendo de mRNA de feocromocitoma. Takeuchi et al. (1985, 1986) aislaron clones de cDNA de los genes NPY y PNP a partir de un feocromocitoma y un tumor endocrino pancreático, respectivamente. Utilizando estas sondas de cDNA para analizar el DNA genómico de paneles de asignación cromosómica de híbridos celulares somáticos humano-ratón, examinaron después la cuestión de si los genes son sinténicos. Los estudios no mostraron sintenia, con NPY en 7pter-7q22 y con PNP en 17p11.1-17qter. Por estudios de retrocruzamiento con Mus spretus, Bahary et al. (1991) mapearon el gen homólogo de NPY en el cromosoma 6 de ratón. Puesto que el cromosoma 6 tiene homología con el 7q humano, es probable que el gen NPY en humano esté localizado en la región 7cen-q22. Meisler et al. (1987) excluyeron ligamientos cercanos entre los loci de la fibrosis cística (219700) y el neuropéptido Y. Terenghi et al. (1987) determinaron la distribución del mRNA que codifica el NPY en neuronas de la corteza cerebral en especímenes de

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

biopsia quirúrgica y cerebro postmortem por medio de técnicas de hibridación in situ. Mostraron una localización consistente de la transcripción y expresión del gen NPY en neuronas corticales maduras normales. Baker et al. (1995) mostró por fluorescencia de hibridación in situ que el gen NPY está localizado en 7p15.1 y que existe en una sola copia. Comentaron que el NPY es uno de los péptidos más conservados conocidos con, por ejemplo, sólo 3 aminoácidos de diferencia entre humano y tiburón. El neuropéptido Y es un neuromodulador implicado en el control del equilibrio de energía y se sobreproduce en el hipotálamo de ratones ob/ob. Para determinar el papel de NPY en la respuesta a la deficiencia de leptina (164160), Erickson et al. (1996) generaron ratones ob/ob deficientes en NPY. En ausencia de NPY, los ratones ob/ob eran menos obesos debido a una menor ingestión de alimento y un mayor gasto de energía, y estaban afectados con una menor gravedad por diabetes, esterilidad y defectos somatrópicos. Estos resultados se interpretaron como indicadores de que NPY es un efector central de la deficiencia de leptina. Los análisis de ligamiento genético de ratas que se criaron selectivamente para mostrar una preferencia por el alcohol, identificaron una región

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

cromosómica que incluía el gen NPY (Carr et al., 1998). Las ratas que prefieren alcohol tuvieron niveles menores de NPY en diversas regiones cerebrales comparadas con las ratas que no prefieren alcohol. Thiele et al. (1998) estudiaron por lo tanto el consumo de alcohol en ratones que carecían completamente de NPY como resultado de una alteración dirigida del gen (Erickson et al., 1996). Encontraron que los ratones deficientes en NPY mostraban un aumento del consumo, comparado con las ratones de tipo silvestre, de disoluciones que contenían etanol al 6%, 10% y 20% (en volumen). Los ratones deficientes en NPY eran también menos sensibles a los efectos sedantes/hipnóticos del etanol, como mostró una recuperación más rápida del sueño inducido por etanol, incluso aunque los niveles de etanol en plasma no diferían significativamente de los de los controles. En contraposición, los ratones transgénicos que sobreexpresaron un gen NPY marcado en neuronas que habitualmente lo expresan, tuvieron una menor preferencia por el alcohol y fueron más sensibles a los efectos sedantes/hipnóticos del etanol que los controles. Estos datos proporcionaron evidencias directas de que el consumo de alcohol y la resistencia son inversamente proporcionales a los

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
[illegible] 113
MADRID
Telef. [illegible]

niveles de NPY en el cerebro. Como parte de un estudio en marcha sobre la base genética de la obesidad, Karvonen et al. (1998) identificaron un polimorfismo 1128T-C que resultaba de la sustitución de leucina por prolina en el residuo 7 de la parte péptido señal de pre-pro-NPY. Este polimorfismo no estaba asociado a la obesidad o al metabolismo energético, pero estaba significativa y consistentemente asociado a altos niveles de colesterol total y colesterol LDL en suero tanto en sujetos finlandeses de peso normal y obesos como en holandeses obesos. Uusitupa et al. (1998) encontró el polimorfismo pro7 en el 14% de los finlandeses, pero sólo en el 6% de los holandeses. Los sujetos con pro7 en NPY tenían, de media, niveles de colesterol total en suero de 0,6 a 1,14 mmol/l mayores que aquellos sin esta variante del gen. Puesto que el impacto de pro7 NPY sobre los niveles de colesterol en suero no pudieron encontrarse en holandeses de peso normal, puede suponerse que las personas obesas son más susceptibles al efecto de la variante del gen. Se calculó que la probabilidad de tener el pro7 en NPY podría ser del orden del 50 o del 60% en sujetos obesos con un colesterol total en suero igual o superior a 8 mmol/l. Al menos entre los finlandeses,

[illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID

la forma pro7 de NPY es uno de los factores genéticos más potentes que afectan a los niveles de colesterol en suero. Véase también Allen y Bloom (1986), Dockray (1986), Maccarrone y Jarrott (1986), Minth et al. (1986)".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a NPYR1 se ha extraido de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY, 162640) es uno de los neuropéptidos más abundantes en el sistema nervioso mamífero y exhibe un variado intervalo de actividades fisiológicas importantes, incluyendo efectos sobre la actividad psicomotriz, ingestión de alimento, regulación de la secreción endocrina central y potentes efectos vasoactivos sobre el sistema cardiovascular. Se han definido dos grandes subtipos de NPY (Y1 e Y2) por criterios farmacólogicos. Los receptores NPY Y1 se han identificado en una serie de tejidos, incluyendo cerebro, bazo, intestino delgado, riñón, testículos, placenta y músculo liso aórtico. El receptor Y2 se encuentra principalmente en el sistema nervioso central. Herzog et al. (1992)

MORENO
MADRID
Telf.

111

informaron de haber clonado un cDNA que codificaba un receptor de NPY humano del que confirmaron que era un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G. Cuando se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón embrionario humano, el receptor exhibió características de especificidad de ligando. En la línea celular de riñón, el receptor se acopló a una proteína G sensible a la toxina pertussis que mediaba la inhibición de la acumulación de AMP cíclico. En la línea celular CHO, por otro lado, el receptor no se acopló a la inhibición de la adenilato ciclasa, sino a la elevación del calcio intracelular. De esta manera, el acoplamiento de segundo mensajero del receptor NPY era específico del tipo celular, dependiendo del repertorio específico de proteínas G y de sistemas efectores presentes en el tipo de célula. Larhammar et al. (1992) clonaron independientemente y caracterizaron el receptor de neuropéptido Y. Herzog et al. (1993) determinaron la organización molecular y la regulación del gen del receptor de NPY Y1. En contraposición con la estructura contigua de la mayoría de los genes del receptor acoplados a proteína G, encontraron que el gen del receptor de NPY Y1 tiene 3 exones.

Identificaron también un polimorfismo Pstl común en el primer intrón del gen. Por hibridación in situ con fluorescencia de alta resolución, localizaron el gen en 4q31.3-q32. Herzog et al. (1997) encontraron que los genes NPY1R y NPY5R (602001) están localizados conjuntamente en el cromosoma 4q31-q32. Los dos genes se transcriben en direcciones opuestas a partir de una región promotora común. Uno de los exones 5' alternativamente ligados al gen del receptor Y1 es una parte de la secuencia de codificación del receptor Y5. Esta infrecuente reordenación sugirió a Herzog et al. (1997) que los 2 genes surgieron por un fenómeno de duplicación del gen y que pueden expresarse coordinadamente. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Lutz et al. (1997) mapearon los genes Npy1r y Npy2r en grupos de ligamiento conservado en los cromosomas 8 y 3 de ratón, respectivamente, que corresponden con la región distal del cromosoma humano 4q".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibid.). El siguiente texto referente a NPYR2 se ha extraído de esa fuente.

PATRICIA ... MORENO
ING ...
... 113
... MADRID
Tel. ...

113

"El neuropéptido Y (NPY) señala una familia de receptores acoplados a la proteína G presente en el cerebro y en neuronas simpáticas. Se han definido al menos 3 subtipos de receptor de neuropéptido Y sobre la base de criteria farmacológicos, distribución en tejido y estructura del gen de codificación, véanse 162641 y 162643. Rose et al. (1995) informaron de la clonación de expresión en células COS de un cDNA para el receptor tipo 2 humano, NPY2R. Las células transfectadas mostraron una alta afinidad por NPY (162640), el péptido YY (PYY, 600781) y un fragmento de NPY que incluía los aminoácidos 13 a 36. La proteína de 381 aminoácidos prevista tiene 7 dominios transmembrana característicos de los receptores acoplados a la proteína G y es sólo un 31% idéntica al receptor Y1 humano (NPY1R, 162641). Se detectó un mRNA de 4 kb por transferencia Northern de muestras de tejido de diversas regiones del sistema nervioso. Gerald et al. (1995) clonaron el cDNA correspondiente al receptor Y2 de una biblioteca de expresión de cDNA de hipocampo humano utilizando un ensayo de unión de PYY marcado con radioisótopos. Expresaron el gen Y2 en células COS-7 y realizaron un ensayo de unión a hormona que mostró que el receptor Y2 se une (de mayor a menor afinidad) a las hormonas PYY, NPY y

MADRID

polipéptido pancreático (PP, 167780). Ammar et al. (1996) clonaron y caracterizaron el gen humano que codifica el receptor NPY de tipo 2. La copia abarca 9 kb de secuencia genómica y está codificada en 2 exones. Como en el gen de receptor NPY de tipo 1, la región no traducida de 5' de NPY2R está interrumpida por una secuencia intermedia de 4,5 kb. Ammar et al. (1996) demostraron por análisis Southern de híbridos celulares roedor-humano seguido de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) que el gen NPY2R se mapea en 4q31, la misma región que contiene el gen NPY1R, sugiriendo que estos subtipos pueden haber surgido de la duplicación del gen a pesar de sus diferencias estructurales. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Lutz et al. (1997) mapearon los genes Npy1r y Npy2r en grupos de ligamiento conservado en los cromosomas 8 y 3 de ratón, respectivamente, que corresponden a la región distal del cromosoma humano 4q".

VIP (péptido intestinal vasoactivo)

Según un aspecto de la presente invención, una diana de $P_{cAMP}$ es VIP o uno de sus receptores asociados. La clasificación/nomenclatura actual se refiere a estos como

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible]
[illegible] ADRID
Telf. [illegible]

VPAC1, VPAC2 y PACAP.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos para VIP y sus receptores están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

Hemos mostrado que VPAC1 y VPAC2 están presentes en la vagina humana y en la de conejo. PACAP estaba ausente tanto en la vagina de conejo como humana.

VIP es un importante neurotransmisor endógeno liberado durante la excitación sexual que es responsable de la vasodilatación vaginal inducida por el nervio del lecho vascular localizado en la pared vaginal. Estos efectos vasodilatadores están mediados por la activación de adenilato ciclasa y la producción de cAMP. Sin pretender limitarse a la teoría, este efecto puede estar mediado a través de receptores de VIP subtipos $VPAC_1$, $VPAC_2$ o PACAP (péptido activador de la adenilato ciclasa en la pituitaria). Los receptores $VPAC_2$ y PACAP son los más ampliamente extendidos en el SNC y estos receptores, a pesar de expresarse en la pituitaria, parecen no tener una función biológica extendida.

MORENO
MAN
113
ADRID

El agente de la presente invención podría potenciar el VIP y/o actuar como un mimético o análogo de éste. El agente potenciaría entonces y/o imitaría los efectos vasorrelajantes del VIP endógeno liberado durante la excitación sexual. El agente puede tener también un efecto aditivo sobre la relajación del músculo liso vaginal inducida por VIP. Clínicamente, esto conducirá al tratamiento de los FSAD mediante el aumento de la lubricación vaginal a través de la congestión y flexibilidad de la pared vaginal.

Un agente adecuado piede ser un análogo de VIP.

Las explicaciones de los antecedentes sobre VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente al VIP se ha extraído de esa fuente.

> "El péptido intestinal vasoactivo (VIP), un péptido de 28 aminoácios aislado originalmente de duodeno porcino, está presente no sólo en tejidos gastrointestinales sino también en tejidos neuronales, posiblemente como neurotransmisor, y

MORENO
AN
113
ADRID

exhibe una amplia variedad de acciones biológicas. Debido a que el VIP muestra similitudes con el glucagón, la secretina y el péptido inhibitorio gástrico (GIP), se ha considerado un miembro de la familia de glucagón-secretina. El producto primario de traducción del mRNA que codifica el VIP (prepro-VIP) tiene un peso molecular de 20 dalton. Por clonación de la secuencia de DNA complementaria al mRNA que codifica el VIP humano, Itoh et al. (1983) encontraron que el precursor de VIP contiene no sólo el VIP sino también un nuevo péptido de 27 aminoácidos, designado como PHM27, que tiene histidina aminoterminal y metionina carboxiterminal. Difiere del PHI17 aislado de intestino porcino en 2 aminoácidos, el PHI27, como su designación indica, tiene isoleucina carboxiterminal. Linder et al. (1987) aislaron el gen humano de VIP y PHM27 y estudiaron su expresión en diversos tejidos de rata. Heinz-Erian et al. (1985) sugirieron que la deficiente innovación de las glandulas sudoríparas de los pacientes con fibrosis quística por el neuropéptido VIP podría ser un mecanismo básico de reducción del contenido de agua y de impermeabilidad relativa del epitelio al cloruro y a otros iones que caracteriza a la fibrosis quística. Para comprobar

ADRID

esta hipótesis, Gozes et al. (1987) adoptaron el enfoque de "gen candidato". Bodner et al. (1985) habían mostrado que el VIP y el PHM-27 están codificados por exones adyacentes. Gozes et al. (1985) utilizaron el fragmento genómico de codificación de PHM-27 para detectar la presencia del gen VIP en 6q21-qter. De esta manera, eliminaron un gen defectivo de VIP como candidato a causa primaria de fibrosis quística (que está codificada en el cromosoma 7). Por técnicas de hibridación in situ, Gozes et al. (1987) asignaron el gen VIP a 6q24. Esto colocó a VIP en la región de MYB (189990), que se ha mapeado en 6q22. Gozes et al. (1987) investigaron una relación funcional entre los 2 genes en tejido neuronal. Observaron un pico agudo de mRNA de MYB en el hipocampo de ratas de 3 días de edad, antes del pico de mRNA de VIP que aparece en este área a los 8 días de edad. Omary y Kagnoff (1987) encontraron receptores nucleares para el VIP en una línea celular de adenocarcinoma colónico humano. Gotoh et al. (1988) asignaron el VIP al cromosoma 6 por hibridación de transferencia de manchas de un fragmento clonado molecularmente del gen a cromosomas clasificados. La localización se refinó a 6q26-q27 por hibridación in situ".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre el VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a VIPR1 o VPAC1 se ha extraido de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP, 192320) es un mediador neuroendocrino octacosamérico encontrado principalmente en neuronas presinápticas colinérgicas del sistema nervioso central y en neuronas peptidérgicas periféricas que inervan diversos tejidos. De los muchos pétidos neuroendocrinos con funciones inmunológicas, el VIP se distingue por su capacidad de afectar tanto a células B como a células T directamente. Los distintos subconjuntos de células neuronales, respiratorias, gastrointestinales e inmunes llevan receptores de alta afinidad específicos de VIP, que están asociados con una proteína de unión al nucleótido guanina (G) capaz de activar la adenilato ciclasa. Libert et al., (1991) obtuvieron 4 nuevos receptores de la familia de receptores acoplados a la proteína G por amplificación selectiva y clonación de cDNA tiroide. Uno de ellos, RDC1, fue identificado como el receptor de VIP por Sreedharan et al (1991). Libert et al. (1991) mapearon el gen VIPR en 2q37 por hibridación in situ. Informaciones posteriores hicieron dudoso que el gen mapeado en 2q37 fuera de hecho el gen del receptor de VIP (Vassart, 1992). La secuencia que designó como GPRN1 Sreedharan et al. (1991) y que se mapeó en 2q37 se encontró que no se unía a VIP según Wenger (1993). Sreedharan et al. (1995) aislaron un gen del receptor de VIP de tipo I auténtico y lo localizaron por fluorescencia de hibridación in situ en la banda de 3p22 en una región asociada al cáncer de pulmón de células pequeñas. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Hashimoto et al. (1999) mapearon el gen Vipr1 de ratón en la región distal del cromosoma 9, una región que muestra homología de sintenia con el cromosoma humano 3p. Sreedharan et al. (1993) clonaron un gen del receptor de VIP intestinal humano, la secuencia de aminoácidos deducida comparte el 84% de identidad con el receptor de VIP de pulmón de rata. Couvineau et al. (1994) aislaron 2 clones de cDNA de VIPR a partir de una biblioteca de cDNA de célula epitelial de yeyuno humano. Uno codifica un receptor de VIP que consiste en 460 aminoácidos y que tiene 7 dominios transmembrana putativos, así como otros receptores acoplados a la proteína G. El otro codifica una proteína relacionada con el receptor de VIP de 495 aminoácidos que exhibe un 100% de homología con el receptor de VIP funcional a lo largo de 428 aminoácidos y en la región C-terminal, pero que contiene un dominio N-terminal completamente divergente de 67 aminoácidos. Cuando se expresa en células COS-7, la segunda proteína no une VIP radioyodado, aunque se dirigió normalmente a la membrana plasmática como se evaluó por estudios de inmunofluorescencia. Sreedharan et al. (1995) encontraron que el receptor de VIP de tipo I, también denominado receptor PACAP de tipo II (véase 102981 para otro tipo de receptor PACAP) abarcaba aproximadamente 22 kb y comprendía 13 exones (entre 42 y 1.400 pb) y 12 intrones (entre 0,3 y 6,1 kb). Sreedharan et al. (1995) caracterizaron también le promotor y la región adyacentedel extremo 5' del gen".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre el VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a VIPR2 o VPAC2 se ha extraido de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP, 192320) y el polipéptido activante de la adenilato ciclasa en

PATENTES KAGEN MORENO
A RID
Telé

pituitaria (PACAP, 102980) son péptidos homólogos que funcionan como neurotransmisores y como hormonas neuroendocrinas. Aunque los receptores de VIP y PACAP comparten homología, difieren en sus especificidades de sustrato y en sus patrones de expresión. Veáse VPR1 (192321) y ADCYAP1R1 (102981). Svoboda et al. (1994) realizaron una PCR de bajo rigor utilizando cebadores basados en secuencias conservadas entre los receptores de VIP. Clonaron el gen del receptor de VIP2 humano de una biblioteca de cDNA de linfoblasto. Este gen codificaba un polipéptido de 438 aminoácidos que comparte el 86% de identidad con el receptor de VIP2 de rata. Expresaron el receptor de VIP2 humano en células de ovario de hámster chino y encontraron que se une a PACAP-38, PACAP-27, VIP y helodermina, y esa unión del receptor a cualquiera de estos péptidos activa la adenilato ciclasa. Se encontró que la unión de los péptidos estaba inhibida por GTP. Adamou et al. (1995) clonaron el gen del receptor de VIP2 de una biblioteca de cDNA de placenta humana. La transferencia Northern reveló que VIPR2 se expresaba como 2 transcriptos de 4,6 kb y 2,3 kb a altos niveles en el músculo esquelético y a niveles menores en corazón, cerebro, placenta y páncreas. Mackay et al. (1996) utilizaron hibridación in situ con

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] DRID
Telé [illegible]

fluorescencia para mapear el gen VIPR2. Posteriores mapeados con líneas celulares derivadas de pacientes con holoprosencefalia tipo 3 (HPE 3, 142945) revelaron que el gen VIPR2 se encuentra en la región crítica mínima HPE3. MacKay et al (1996) afirmaron que aunque VIPR2 puede contribuir al fenotipo de HPE3, no es el único factor responsable".

AC (adenilato ciclasa)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es la AC.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de AC están disponibles en la bibliografía.

Para confirmar que el VIP induce la vasorrelajación a través de la elevación de los niveles de cAMP intracelular y la consiguiente activación de la adenilato ciclasa, se han medido las concentraciones de cAMP vaginal durante la estimulación con VIP y se ha utilizado forscolina, un activador de adenilato ciclasa, para imitar los efectos de activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa.

En estos estudios, se encuentra que el tratamiento con VIP y forscolina eleva las concentraciones intracelulares de cAMP en tejido vaginal aislado.

También se encuentra que la forscolina aumenta el flujo sanguíneo vaginal en un modelo animal de excitación sexual.

Además encontramos que la forscolina induce la relajación en la vagina aislada.

Las explicaciones de los antecedentes sobre la AC y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a la AC se ha extraído de esa fuente.

> "La adenilato ciclasa (EC 4.6.1.1) cataliza la transformación de ATP en AMP cíclico. La actividad enzimática está bajo el control de varias hormonas, y, diferentes polipéptidos participan en la transducción de la señal del receptor al resto catalítico. Los receptores estimuladores o inhibidores (Rs y Ri) interactúan con las proteínas G (Gs y Gi) que exhiben actividad GTPasa y modulan la actividad de la subunidad catalítica de la adenilato

PATRICIA K[illegible] MORENO
[illegible] AN
ING. [illegible]
C [illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

125

ciclasa. Parma et al. (1991) clonaron un cDNA correspondiente a adenililciclasa de cerebro humana, simbolizada por ellos como HBAC1. Por hibridación in situ a extensiones cromosómicas en metafase utilizando la sonda de cDNA de cerebro humano, Stengel et al. (1992) mostraron que el gen está localizado en 8q24.2. Se asignó un gen altamente homólogo, ADCY2 (103071) a 5p15.3 mediante el mismo procedimiento".

## TECNICAS DE METODOLOGIA GENERAL DE DNA RECOMBINANTE

Aunque en general las técnicas mencionadas en la presente son bien conocidas en la técnica, puede hacerse referencia en particular a Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) y a Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999), 4ª edición, John Wiley & Sons, Inc. Se describe la PCR en los documentos US-A-4683195, US-A-4800195 y US-A-4965188.

## SUMARIO

En resumen, la presente invención se refiere a:

1. Una composición farmacéutica para uso consiguiente en

[illegible] MORENO [illegible] MADRID

el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD.

3. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

tratar FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto a un agente con cAMP y medir la actividad de cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a:

5. Una composición farmacéutica para uso consiguiente en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$

PATENTE ... MORENO
... AN
ING ... 113
... ADRID
Telef. 51...

A:AC

A:VIPr

A:VIP$_n$

I:I:VIPr

I:I:VIP$_n$

P$_{cAMP}$.

6. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, siendo el agente capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP

I:PDE$_{cAMP}$

I:PDEn$_{cAMP}$

I:NPY

I:NPY Y$_n$

I:NEP

U:A$_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:VIP$_n$

I:I:VIPr

I:I:VIP$_n$

PATENTES ... MORENO
... AN
... 113
Teléf. 51... - MADRID

$P_{cAMP}$.

7. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP

I:$PDE_{cAMP}$

I:$PDEn_{cAMP}$

I:NPY

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

$P_{cAMP}$.

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible]
[illegible] RID
Tel: [illegible]

8. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo la determinación de si un agente putativo es capaz o no de actuar como uno o más de:

un mimético de cAMP

I:PDE$_{cAMP}$

I:PDEn$_{cAMP}$

I:NPY

I:NPY Y$_n$

I:NEP

U:A$_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:VIP$_n$

I:I:VIPr

I:I:VIP$_n$

P$_{cAMP}$.

en el que si el agente putativo es capaz de actuar como uno más de

un mimético de cAMP

I:PDE$_{cAMP}$

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Telé.

$I{:}PDEn_{cAMP}$

I:NPY

$I{:}NPY\ Y_n$

I:NEP

$U{:}A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

$A{:}VIP_n$

I:I:VIPr

$I{:}I{:}VIP_n$

$P_{cAMP}$.

entonces el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a:

9. Una composición farmacéutica para uso consiguiente en la estimulación del flujo sanguíneo vaginal, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimlar la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL[illegible]
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

10. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal, siendo el agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra.

11. Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra de modo que produzca un aumento del flujo sanguíneo vaginal.

**EJEMPLOS**

La presente invención se describirá a continuación, sólo como ejemplos, en los que se hace referencia a las siguientes Figuras:

La Figura 1 que es un gráfico,
La Figura 2 que es un gráfico,
La Figura 3 que es un gráfico,
La Figura 4 que es un gráfico,
La Figura 5 que es un gráfico,
La Figura 6 que es un gráfico,
La Figura 7 que es un gráfico, y

MORENO
AN
MADRID

La Figura 8 que presenta algunas fórmulas de compuestos.

Más detalladamente:

Figura 1. Estimulación eléctrica del nervio pélvico que induce un aumento dependiente de la frecuencia del flujo sanguíneo vaginal en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Al aumentar la frecuencia de estimulación se inducen mayores aumentos del flujo sanguíneo. Se monitorizaron los cambios utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 2. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. La Figura 2A (figura del lado izquierdo) ilustra cómo aumenta el flujo sanguíneo vaginal de manera dependiente de la concentración por infusiones de VIP (bolo intravenoso). La Figura 2b (figura del lado derecho) demuestra que 2 infusiones repetidas de VIP producen aumentos similares del flujo sanguíneo. Obsérvese que la duración de la respuesta es también similar. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 3. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) reduce la

MORENO
113
ADRID

presión sanguínea arterial media en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Este gráfico ilustra los efectos típicos de los agentes vasoactivos, y los parámetros de estimulación utilizados para investigar el flujo sanguíneo en la vagina, respecto a la presión arterial media en un conejo anestesiado. Estos efectos observados son típicos de las tendencias vistas en todos los animales ensayados. El VIP indujo una depresión significativa de la presión arterial media mientras la estimulación del nervio pélvico, no teniendo efecto las infusiones de control de hepsalina o de inhibidores de $PDE_{cAMP}$ o NEP sobre la presión sanguínea. Obsérvese que la reducción de la presión sanguínea asociada con las infusiones de VIP está también asociada a un gran aumento del ritmo cardiaco.

Figura 4. La activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa imita la vasorrelajación mediada por VIP y la relajación de músculo liso en tejido vaginal. La Figura 4a ilustra que una infusión de forscolina (un mimético de cAMP, 40 nmol/kg/bolo intravenoso) induce aumentos significativos del flujo sanguíneo vaginal. Obsérvese que la amplitud y duración de la respuesta es similar a la inducida por el VIP (1,0 µg/kg bolo intravenoso). Resulta interesante que los efectos sobre el flujo sanguíneo tienen

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
[illegible]

una duración mayor de acción sobre la pared vaginal externa. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler. La Figura 4b demuestra que tanto el VIP (0,1 μM) como la forscolina (10 μM) elevan significativamente las concentraciones intracelulares de cAMP por encima de los niveles basales en vagina de conejo. La Figura 4c muestra que la forscolina induce potentes relajaciones en bandas vaginales de conejo precontraídas (1 μM de fenilefrina) con un CI de aproximadamente 300 nM. Se cuantificaron todos los cambios utilizando tecnologías de láser Doppler in vivo, enzimoinmunoensayo de cAMP bioquímico o de relajación de tejidos in vitro.

Figura 5. Un inhibidor selectivo de NEP EC 3.4.24.11 estimula el aumento del flujo sanguíneo vaginal por estimulación del nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. PNS repetidas con intervalos de 20 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal. La administración de un inhibidor de NEP (7,5 mg/kg, bolo intravenoso, círculos negros) estimula el aumento del flujo sanguíneo vaginal inducido por PNS en un 53%. La infusión control de hepsalina (círculos blancos) no tuvo efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler. Obsérvese que después de la

7ª estimulación (20 minutos después del bolo intravenoso de NEPi), la estimulación del flujo sanguíneo disminuye, lo que refleja la eliminación y/o metabolismo del inhibidor NEP en el conejo. En la 9ª estimulación (60 minutos después de NEPi) los aumentos inducidos por PNS han vuelto a los valores de control.

Figura 6. Los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 estimulan los aumentos de flujo sanguíneo vaginal inducidos por VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las infusiones de VIP repetidas en intervalos de 30 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b). El inhibidor de NEP potencia la amplitud y prolonga la duración del flujo sanguíneo estimulado cuando estos aumentos estan inducidos por dosis submáximas de VIP, por ejemplo 0,3 µg/kg. A dosis de VIP que inducen aumentos máximos del flujo sanguíneo vaginal, por ejemplo 3 µg/kg, los inhibidores de NEP potencian sólo la duración del flujo sanguíneo vaginal. Se muestran los aumentos inducidos por VIP en presencia de un inhibidor de NEP como triángulos negros, mostrándose las respuestas de control VIP como triángulos blancos. La infusión de control de hepsalina no tiene efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando técnologías de láser Doppler.

Figura 7: Un inhibidor selectivo de PDE$_{cAMP}$ de tipo 2 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal inducidos por el VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las infusiones de VIP repetidas en intervalos de 30 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b). Un inhibidor selectivo de PDE$_{cAMP}$ de tipo 2 (25 µg/kg, bolo intravenoso) potencia la duración del flujo sanguíneo vaginal estimulado inducido por VIP (3 µg/kg, bolo intravenoso). Los aumentos inducidos por el VIP en presencia de un inhibidor de PDE$_{cAMP}$ se muestran como triángulos negros, mientras que las respuestas control de VIP se muestran como triángulos blancos. La infusión control de hepsalina no tuvo efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

UN ENSAYO PARA MEDIR LAS ACTIVIDADES/NIVELES DE cAMP

Medida de cAMP en muestras de tejidos vaginales utilizando un estuche de enzimoinmunoensayo (EIA) para cAMP de Biotrak (Amersham Life Sciences RPN 225).

Los niveles de cAMP se miden por EIA en muestras de tejido vaginal. El EIA se basa en la competición entre cAMP sin marcar y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa para una cantidad limitada de anticuerpo específico de cAMP.

## 1. MATERIALES

Todos los materiales son suministrados por el estuche EIA para cAMP de Amersham Life Sciences (RPN 225), a menos que se indique otra cosa.

1.1 Placa de microvaloración. Placa de 96 pocillos recubierta con IgG de asno anti-conejo.

1.2 Tampón de ensayo. Tampón acetato de sodio 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Los contenidos del frasco se transfieren a una probeta graduada utilizando lavados de agua destilada, 3 x 15 ml. El volumen final se ajusta entonces a 500 ml.

1.3 Patrón de cAMP (para el procedimiento de acetilación). cAMP a 10,24 pmol/ml en tampón acetato 0,05, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Se disuelve el patrón en 2,5 ml de tampón de ensayo para su uso.

1.4 Antisuero. Anticuerpo anti-cAMP en tampón acetato 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Antes de su

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] RID

uso, se diluye el anticuerpo con 11 ml de tampón de ensayo y se mezcla por inversión suave para disolver los contenidos.

1.5 Conjugado de cAMP. cAMP-peroxidasa de rábano picante en tampón acetato 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Antes de su uso, se diluye la disolución con 11 ml de tampón de ensayo y se mezcla por inversión suave para disolver los contenidos.

1.6 Tampón de lavado. Tampón fosfato 0,01 M, pH 7,5, que contiene Tween™20 al 0,05% (v/v) tras su reconstitución. Se transfieren los contenidos del frasco a una probeta graduada utilizando lavados de agua destilada, 3 x 15 ml. El volumen final se ajusta a 500 ml.

1.7 Sustrato TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)/peróxido de hidrógeno en dimetilformamida al 20% (v/v).

Preparado para su uso.

1.8 Reactivo de acetilación. 2 ml de anhídrido acético, 4 ml de trietilamina, preparado según sea necesario.

1.9 Acido sulfúrico (1M). Se prepara ácido sulfúrico 1 M a partir de una disolución madre 18M (BDH).

Se añaden 1,11 ml a 18,8 ml de agua destilada.

## 2. EQUIPAMIENTO ESPECIFICO

2.1 Tubos de ensayo de vidrio de 5 ml desechables.

2.2 Lector espectrofotométrico de placas (Spectra max 190)

2.3 Agitador de placas de microvaloración (Luckham R100).

## 3. PROCEDIMIENTOS

- Preparación de muestras de tejido. Se trataron los tejidos con el pretratamiento relevante en muestras de 5 ml en disolución salina fisiológica, por ejemplo, agonistas, miméticos de cAMP, etc. Después del tratamiento, las muestras se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y después se trituraron utilizando un martillo. Se rascó el polvo en un tubo de centrífuga y se añadió 1 ml de ácido perclórico (PCA) 0,5 M enfriado con hielo. Se agitó en Vortex la muestra, se mezcló y se dejó en hielo durante 1 hora.
- Extracción de cAMP de muestras de tejido. Se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en otros tubos de centrífuga. Se conservó el sedimento para análisis de proteína a -80°C. Se neutralizaron después las muestras de sobrenadante a pH 6 utilizando $K_3PO_4$. Se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se recuperó el

sobrenadante y se lavó 4 veces con 5 volúmenes (5 ml) de éter dietílico saturado de agua. Se desechó la capa superior de éter después de cada lavado. Se transfirió la capa acuosa a un tubo corto de vidrio fino y se secó en atmósfera de nitrógeno a 60°C. Se disolvió el extracto seco en 1 ml de tampón de ensayo y se almacenó en nevera hasta que fue necesario (o también puede congelarse).

- Se equilibran las disoluciones madre de los reactivos a temperatura ambiente y se preparan las disoluciones de trabajo.

- Se preparan los patrones de cAMP en tubos de vidrio etiquetados como 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 fmol. Esto se consigue añadiendo 1 ml de tampón de ensayo a todos los tubos excepto al de patrón de 512 fmol. Se añade entonces 1 ml de patrón de acetilación (10,24 pmol/ml) a los dos patrones superiores (256 y 512 fmol. Se agita con Vortex el patrón de 256 fmol y se transfiere 1 ml al patrón de 128 fmol. Esto se vuelve a llevar a cabo hasta el patrón de 2 fmol, en el que se dispone 1 ml de disolución. Se establece un tubo patrón cero que contiene 1 ml de tampón de ensayo.

- Se descongelan las muestras de extractos de tejidos en hielo (si es necesario) y se diluyen 1 a 100 (10 µl de muestra en 990 µl de tampón de ensayo) en tubos de vidrio etiquetados.

PATENTA ... MORENO
ING... IAN
... 113
... MADRID
Telf. ...

142

- Se acetila el cAMP en todos los patrones y muestras por adición de 100 $\mu$l de reactivo de acetilación, en campana de gases, que se añaden en un lado del tubo antes de la inmediata agitación en Vortex.
- Se añaden 50 $\mu$l de todos los patrones y muestras a los pocillos apropiados de la placa de 96 pocillos, y se añaden 150 $\mu$l de tampón de ensayo a los pocillos de unión no específica (NSB).
- Se añaden 100 $\mu$l de antisuero a todos los pocillos excepto a los blancos (B) y a los NSB antes de incubar durante 2 horas a 3-5°C
- Después de la incubación, se añaden 100 $\mu$l de conjugado cAMP-peroxidasa a todos los pocillos excepto a los B antes de 1 hora más de incubación a 3-5°C.
- Se vacían las placas dándoles la vuelta y transfiriendo a un papel absorbente antes de lavar cada pocillo cuatro veces con 400 $\mu$l de tampón de lavado. Después de cada lavado se retransfieren las placas para asegurar que se extrae cualquier tampón de lavado residual. Se añaden inmediatamente después 200 $\mu$l de TMB a todos los pocillos.
- Se ponen las placas en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 100 $\mu$l de ácido sulfúrico 1 M en todos los pocillos. Se lee la densidad óptica en un dispositivo Spectra max 190 a 450

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

nm durante 30 minutos.

4. PATRONES

Se establecen con cada ensayo los siguientes tubos patrones:

4.1 Adición de un patrón en tampón de ensayo

Se añade una cantidad conocida de cAMP en tampón de ensayo para determinar la eficacia del ensayo. Se añaden 70 pmol/ml de cAMP al tampón de ensayo, que es equivalente a 35 fmol/pocillo en el ensayo, que está en la mitad de la curva de respuesta a la dosis.

Para preparar 1 ml de patrón: 68,4 µl de patrón 521 fmol/pocillo en 931,6 µl de tampón de ensayo

4. Efectos de los compuestos sobre la placa

Se establecen los patrones para determinar si el compuesto utilizado en los estudios funcionales tiene algún efecto sobre la placa de 96 pocillos o si afecta a la unión de cAMP. Estos incluyen:

- Adición del compuesto en tampón de ensayo por separado para evaluar los efectos del compuesto directamente sobre la placa.

- Adición del compuesto en plasma que contiene niveles basales de cAMP para evaluar los efectos del compuesto sobre la unión de cAMP a la placa.

Se añaden concentraciones 5 nM de compuesto a cada patrón. Se elige 5 nM porque los niveles de medicamento total al final de la infusión han sido en el pasado de aproximadamente 150-300 nM. Se diluyen las muestras 1:100 antes de ensayar, por lo tanto 5 nM permite concentraciones de medicamento mayores de las esperadas al final de la infusión.

## 5. CALCULOS

El lector de placas Spectra max lee la densidad óptica (DO) a 450 nm.

La curva patrón se genera por representación del $\%B/B_0$ (eje y) frente a fmol/pocillo de cAMP (eje x) en Spectra max.

El $\%B/B_0$ (% unido) para cada muestra y patrón se calcula como sigue:

$B_0$ = patrón cero (véase el procedimiento 3.2).

ADRID

$$\%B/B_0 = \frac{\text{(DO de patrón o muestra-DO de NSB)}}{\text{(DO de } B_0 \text{ - DO de NSB)}} \times 100$$

El volumen fmol/pocillo puede leerse entonces directamente en la curva patrón para cada muestra. Entonces se convierten los valores en pmol/ml antes de tomar la media de cada par de muestras.

Conversión de valores de fmol/pocillo a pmol/ml:

fmol a pmol = dividir entre 1000

volumen en pocillo = 50 $\mu$l ... (x1000)

50

La muestra se diluye 1/100, así que en conjunto = 1 x 1000/1000 x 100/50 = 2

Así que todos los valores de fmol/pocillo se multiplican por 2 para dar pmol/ml.

## MODELO DE ENSAYO ANIMAL

### LA POTENCIACION DE LOS EFECTOS DEL 3'-5'-MONOFOSFATO DE ADENOSINA CICLICO (cAMP) DA COMO RESULTADO AUMENTOS DEL FLUJO SANGUINEO VAGINAL EN EL MODELO EN CONEJO ANESTESIADO DE EXCITACION SEXUAL.

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
Telf. [illegible]

## 1.0 Objetivos

1. Desarrollar y validar un modelo animal de excitación sexual femenina.
2. Identificar el (los) mecanismo(s) responsable(s) de la regulación del flujo sanguíneo vaginal en conejo anestesiado.
3. Identificar los enfoques potenciales para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal.
4. Investigar el(los) mecanismo(s) que subyacen a la relajación del músculo liso vaginal e identificar los enfoques potenciales para la estimulación de la relajación vaginal.

## 2.0 Introducción

La respuesta de excitación sexual normal consiste en una serie de respuestas fisiológicas que se observan durante la excitación sexual. Estos cambios, como congestión vaginal, labial y clitorídea son el resultado de aumentos en el flujo sanguíneo genital. La congestión conduce a un aumento de la lubricación a través de la trasudación de plasma, aumento de la flexibilidad vaginal (relajación del músculo liso vaginal) y aumento de la sensibilidad vaginal y clitorídea.

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 13
[illegible] ADRID
Telf. [illegible]

147

El trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) es un trastorno sexual altamente prevalente que afecta a mujeres pre-, peri- y postmenopáusicas (±HRT). La consecuencia primaria del FSAD es la falta de congestión o tumefacción, que se manifiesta como falta de lubricación vaginal y falta de sensación genital placentera. Las consecuencias secundarias incluyen una reducción del deseo sexual, dolor durante el coito y dificultades para conseguir un orgasmo. La causa más común de los FSAD es una reducción del flujo sanguíneo genital que se traduce en una reducción de la congestión vaginal, labial y clitorídea. (Park 1997, Goldstein 1998, Berman 1999a, Werbin 1999). Nuestro objetivo es restablecer o imitar la respuesta de excitación sexual normal en mujeres que sufren FSAD por estimulación del flujo sanguíneo genital.

En los estudios de los presentes autores se ha identificado el cAMP (3',5'-monofosfato de adenosina cíclico) como un mediador de la vasorrelajación vaginal utilizando tecnología de láser Doppler para medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo genital. Esto ha implicado desarrollar un modelo animal de excitación sexual y demostrar que los datos imitan los cambios fisiológicos observados durante la excitación sexual femenina. El modelo se ha utilizado entonces para identificar y validar mecanismos que

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 13
[illegible] ADRID

estimulan el flujo sanguíneo genital, por ejemplo por potenciación directa o indirecta de la vasorrelajación mediada por cAMP.

## 3.0 Procedimientos

### 3.1 *Protocolo anestésico*

Se premedicaron conejos hembra de Nueva Zelanda (aproximadamente 2,5 kg) con una combinación de medetomidina (Dormitor$^{(R)}$) 0,5 ml/kg intramuscular, y ketamina (Vetalar$^{(R)}$) 0,25 ml/kg intramuscular manteniendo la toma de oxígeno con una mascarilla facial. Se traqueotomizaron los conejos utilizando un tubo endotraqueal sin boquilla Portex™ 3ID conectado a un ventilador y se mantuvieron a una tasa de ventilación de 30-40 respiraciones por minuto, con un volumen de flujo periódico aproximado de 18-20 ml y una presión máxima en las vías aéreas de 10 cm de $H_2O$. Se cambió entonces la anestesia a isoflurano y siguió la ventilación con $O_2$ a 2 l/min. Se canuló la vena marginal de la oreja derecha utilizando un catéter 23G o 24G y se perfundió una disolución Ringer con lactato a 0,5 ml/min. Se mantuvo el conejo con isoflurano al 3% durante la cirugía invasiva, bajando a 2% para la anestesia de mantenimiento.

PATENTE ... INC ... MADRID Telé...

### 3.2 *Canulación de vasos*

Se afeitó el área de la ingle izquierda del conejo y se realizó una incisión vertical de aproximadamente 5 cm de longitud a lo largo del muslo. Se expusieron la vena y la arteria femorales, se aislaron y se canularon con un catéter de PVC (17G) para la infusión de medicamentos y compuestos. Se repitió la canulación para la arteria femoral, insertando el catéter a una profundidad de 10 cm para asegurar que el catéter alcanzaba la aorta abdominal. Se unió el catéter arterial a un sistema Gould para registrar la presión sanguínea. Se tomaron muestras para análisis de gases en sangre a través del catéter arterial. Se midieron las presiones sistólica y diastólica y se calculó la presión arterial media utilizando la fórmula (diastólica x 2 + sistólica) : 3. Se midió el ritmo cardiaco mediante un oxímetro de pulsos y el sistema Ponemah.

### 3.3 *Estimulación del nervio pélvico*

Se realizó una incisión ventral de línea media en la cavidad abdominal. La incisión fue de unos 5 cm de longitud justo por encima del pubis. La grasa y el músculo se apartaron directamente para descubrir el nervio

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
c [illegible] nº. 113
Teléf. 519 [illegible] - MADRID

hipogástrico que recorre la cavidad corporal. Era esencial mantenerse cerca del lado curvo de la pared del pubis para evitar dañar la vena y la arteria femorales que se encuentran por encima del pubis. Los nervios ciático y pélvico se encuentran más profundos y fueron localizados después de una disección adicional del lado dorsal del conejo. Una vez se identificó el nervio ciático, se localizó fácilmente el nervio pélvico. Encontramos que la estimulación del nervio produce un aumento del flujo sanguíneo vaginal y la inervación de la región pélvica. El nervio pélvico se liberó del tejido circundante y se colocó un electrodo estimulante Harvard dipolar alrededor del mismo. Se levantó ligeramente el nervio para proporcionar algo de tensión, después se aseguró el electrodo en la posición. Se colocó aproximadamente 1 ml de aceite de parafina ligera alrededor del nervio y el electrodo. Esto actúa como lubricante protector para el nervio y evita la contaminación de la sangre con el electrodo. Se conectó el electrodo a un estimulador Grass S88. Se estimuló el nervio pélvico utilizando los siguientes parámetros: 20V, anchura del pulso 0,5 ms, duración del estímulo 10 segundos e intervalo de frecuencia de 2 a 16 Hz. Se obtuvieron respuestas reproducibles cuando se estimuló el nervio cada 15-20 minutos.

PATENTES [illegible] MORENO [illegible] MADRID

Se determinó una curva de respuesta a la frecuencia al inicio de cada experimento para determinar la frecuencia óptima para usar como respuesta submáxima, normalmente 4 Hz. El(los) compuesto(s) a ensayar se infundieron, a través de la vena femoral, utilizando una bomba de infusión Harvard 22, permitiendo un ciclo de estimulación continuo de 15 minutos.

### 3.4 *Colocación de las sondas de láser Doppler*

Se realizó una incisión ventral de línea media en el extremo caudal del pubis para exponer el área púbica. Se expuso la pared vaginal externa por eliminación del tejido conectivo. Se insertó una sonda de flujo de láser Doppler 3 cm en la vagina, de modo que el eje de la sonda siguiera visible. Se ajustó entonces la posición de estas sondas hasta obtener una señal. Se colocó una segunda sonda justo por encima de la superficie de un vaso sanguíneo de la pared vaginal externa. Ambas sondas se fijaron en sus posiciones.

Se registró el flujo sanguíneo vaginal directamente como números a partir del medidor de flujo, o indirectamente a partir de la señal del registro gráfico Gould. Se fijó la calibración al inicio del experimento (0-62,5 ml/min/100

MORENO
MADRID

g tejido).

### 3.5 *Infusión de péptido intestinal vasoactivo (VIP)*

Las dosis de VIP (Bachem, H-3775) infundidas fueron 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 µg/kg intravenosas y se infundieron en un volumen de 0,5 ml de suero salino. El VIP se infundió utilizando una bomba Harvard 22, infundiendo a 500 µl/min a través de una llave de tres vías en la vena femoral. Después de la infusión de VIP, se lavó el catéter con suero salino heparinizado (Hepsalina) de modo que no quedara VIP en el catéter.

Para experimentos que utilizan infusiones de VIP, existía la necesidad de una dosis inicial de sensibilización (10 nM), para poder obtener respuestas reproducibles. Se infundió una infusión inicial de Hepsalina (50 UI/ml) que actuara como control negativo.

### 3.6 *Infusión de inhibidores*

Se prepararon inhibidores de NEP (endopeptidasa neutral EC3.4.24.11), inhibidores de fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE5) e inhibidores de PDE2 en suero salino o disolución de glucosa al 5% (200 µl de glucosa al 50% en 1,8 ml de

[illegible]
[illegible]
c. [illegible], 113
Teléf. 519 [illegible] MADRID

agua para inyecciones). Los inhibidores se infundieron a la misma velocidad que el VIP. Los inhibidores de NEP se dejaron durante 30 minutos antes de la curva de respuesta a la dosis de VIP, mientras que los inhibidores de PDE5 y PDE2 se dejaron durante 15 minutos.

### 3.7 *Medida de la relajación del músculo liso en vagina de conejo aislada*

3.7 (a). Preparación de vagina de conejo in vitro: Se sacrificaron conejos blancos hembras de Nueva Zelanda (2,0-3,0 kg) por dislocación cervical. Se abrió la cavidad abdominal y se extrajo la vagina. Se montaron longitudinalmente bandas de tejido en cámaras de órganos silanizadas de 5 ml de Wesley Co. con suturas de seda trenzada (calibre 6/0) a una tensión en reposo inicial de 1,5 Kg en tampón bicarbonato de Krebs mantenido a 37°C y gasificado con 95% $O_2$/5% $CO_2$. Se unió la ligadura superior de cada banda de tejido a un transductor de desplazamiento de fuerza de 10 g de capacidad y se midieron y registraron los cambios en la fuerza isométrica utilizando un sistema de captura de datos in vitro DART. Se dejaron equilibrar los tejidos durante 1,5 horas y se lavaron regularmente con Krebs.

PATRICIA K EEN MORENO
[illegible] MADRID

154

3.7 (b). Relajación inducida por el péptido intestinal vasoactivo en vagina de conejo: Se contrajo cada tejido utilizando una concentración de baño 1 µM de fenilefrina. Cuando la respuesta contráctil alcanzó una meseta estable (aproximadamente 15 minutos), se añadió acumulativamente VIP a la cámara de órganos en unidades logarítmicas para producir concentraciones de 0,1 a 100 nM. Se midieron las respuestas de relajación 5 minutos después de la adición de cada concentración de VIP, consiguiéndose la máxima relajación en ese momento. Después los tejidos recibieron un agente de ensayo (por ejemplo inhibidor de NEP o de PDE) o el vehículo DMSO (control de tiempo coincidente).

3.7 (c). Análisis de datos para experimentos de relajación por VIP: Para cada curva de respuesta concentración de VIP-relajación, se expresaron las respuestas de relajación inducidas por VIP como un porcentaje de la contracción máxima inducida por fenilefrina. Estos valores se representaron entonces frente al logaritmo de la concentración de VIP y se ajustaron a curvas sigmoideas. Con fines de ajuste de curvas, se limitó la respuesta de relajación mínima al 0% y se dejó ajustar libremente la máxima respuesta de relajación. Se determinó la concentración de VIP requerida para producir una relajación del 50% de la contracción de fenilefrina ($CE_{50\,PE}$).

MADRID

3.7 (d). Relajación estimulada por campo eléctrico de vagina de conejo: Se prepararon las bandas vaginales de conejo como se ha descrito en la sección 3.7 (a). Se montaron las bandas de tejido entre dos electrodos de platino situados en la parte superior e inferior de la cámara de órganos, separados unos 4 cm. Cada tejido se contrajo utilizando una concentración de baño 1 µM de fenilefrina. Cuando la respuesta contráctil alcanzó una meseta estable (15 minutos), los tejidos experimentaron un pretratamiento de curva de relajación inducida estimulada por campo eléctrico (EFS). Este se realizó a entre 40 y 60 voltios utilizando frecuencias secuenciales de 2, 4, 8 y 16 Hz suministradas como series de 10 segundos con anchura de pulso de 0,5 ms. Se dejaron volver los tejidos a la línea base de tensión precontráctil entre cada frecuencia (5 minutos) y se registró la extensión de la respuesta de relajación.

Después de terminar el pretratamiento de curva de respuesta inducida por EFS, se lavaron todos los tejidos durante 15 minutos, dejando a los tejidos volver a la tensión de línea base. Entonces los tejidos recibieron un agente de ensayo (por ejemplo un inhibidor de NEP o de PDE, inhibidor de óxido nítrico sintasa (NOS)) o vehículo DMSO (control de tiempo coincidente). Se recontrajeron los tejidos con

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
Teléf. [illegible]

156

fenilefrina (1 µM) 15 minutos después de la adición del compuesto o de vehículo y se determinó una curva de respuesta de relajación inducida por EFS como se ha descrito anteriormente.

Para los experimentos EFS, se complementó el medio Krebs con atropina (10 µM) y guanetidina (150 µM) para eliminar cualquier inervación colinérgica o adrenérgica de la vagina.

### 3.8 *Medida de los niveles de cAMP en vagina de conejo aislada*

Se realizó la medida de las concentraciones de cAMP a partir de extractos de tejido vaginal utilizando un estuche de enzimoinmunoensayo (EIA) de cAMP Biotrak (Amersham Life Sciences, RPN 225). Se trataron las muestras de tejido vaginal aislado con agentes de ensayo (por ejemplo forscolina o VIP). Después de 5 minutos, se congelaron inmediatamente las muestras utilizando nitrógeno líquido, se homogeneizaron y se extrajo el cAMP. Se miden los niveles de cAMP por EIA. El EIA está basado en la competición entre el cAMP sin marcar y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa para una cantidad limitada de anticuerpo específico de cAMP.

MORENO
MADRID
Telé.

### 3.9 *Medida de la actividad fosfodiesterasa (PDE) en vagina de conejo aislada*

Se obtuvieron extractos de citosol de pared vaginal humana de ABS Inc., Delaware (edad de las donantes de 41 a 60 años). Se separaron las isoenzimas PDE por cromatografía de intercambio aniónico Mono-Q y se caracterizaron basándose en su selectividad de sustrato, su sensibilidad a moduladores alostéricos y en sus inhibidores selectivos. También se realizaron análisis Western utilizando anticuerpos de isoenzimas específicas de PDE para detectar la expresión de PDE en la vagina humana.

Todos los datos se comunican como media ± s.e.m.

## 4.0 Resultados y Discusión

### 4.1 *Modelo animal de excitación sexual*

En los estudios de los presentes autores se ha desarrollado un modelo reproducible y robusto de la fisiología de la excitación sexual. Utilizando este modelo de conejo anestesiado, son capaces de medir pequeños cambios del flujo sanguíneo genital utilizando tecnología de láser Doppler. La estimulación del nervio pélvico se utiliza para

PATRICIA [illegible] ENO
[illegible] AN
ING [illegible] 13
[illegible] ADRID
Telf. [illegible]

simular los efectos neuronales de la excitación sexual.

Se ha encontrado que la estimulación del nervio pélvico inducía aumentos dependientes de la frecuencia del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 1). Estos aumentos son significativos cuando se registran en la pared intra o extravaginal. La estimulación del nervio pélvico a 2Hz indujo una elevación media del flujo sanguíneo vaginal máximo de 10,3 ± 1,8, a 4 Hz 20,0 ± 4,6, a 8 Hz 36,3 ± 4,8 y a 16 Hz 46,6 ± 4,7 ml/min/100 g de tejido (n= 4), 15-20 V, 0,5 ms, 10 s). Estos valores son de amplitud similar a los observados anteriormente en estudios humanos y en modelos animales de excitación (Berman 1999a, Park 1997).

Se ha encontrado que la estimulación submáxima del nervio pélvico da como resultado aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (por ejemplo la estimulación con 4 Hz cada 15 minutos proporcionó un aumento medio de 8,50 ± 0,10 ml/min/100 g de tejido, n= 8). Esta reproducibilidad se mantiene durante hasta 5 horas. Podemos utilizar la reproductibilidad de estas respuestas para investigar a) la identidad de los agentes/mecanismos vasoactivos endógenos que median la congestión vaginal y b) la influencia de los medicamentos que pueden ser eficaces en la estimulación del flujo sanguíneo vaginal.

MORENO
AN
113
ADRID
Teléf. 51

Los autores encontraron que no hay efectos cardiovasculares adversos asociados a la estimulación del nervio pélvico en el conejo anestesiado (véase la figura 3).

El flujo sanguíneo vaginal aumenta durante la excitación sexual (Berman, 1999) a través de un aumento del suministro de sangre arterial (la arteria vaginal, la rama vaginal de la arteria uterina, la arteria genital interna y las ramas medias de la arteria media rectal están todas implicadas en el suministro de sangre a la vagina). El nervio pélvico, que tiene su origen en las regiones espinales S2/S4, inerva la vagina inferior y los vasos sanguíneos relacionados. Mediante la estimulación del nervio pélvico, se puede simular los efectos sobre el flujo sanguíneo observados durante la excitación sexual, es decir, un aumento del flujo sanguíneo vaginal arterial. De forma interesante, el aumento de flujo sanguíneo arterial no se ve reflejado en un vaciado venoso que permita a las redes capilares congestionarse con la sangre. La congestión vaginal conduce a la lubricación vaginal a través de trasudación de plasma y esta es una de las primeras respuestas pélvicas observadas durante la estimulación sexual. Los neurotransmisores que se liberan con la estimulación del nervio pélvico o durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. Los nervios que contienen los

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

neuropéptidos y otros candidatos a neurotransmisores que inervan la vasculatura y microvasculatura de la vagina y del clítoris, han sido identificados inmunohistoquímicamente. Estos estudios indican que el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), el neuropéptido Y (NPY), óxido nítrico sintasa (NOS), la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) están todos presentes en los nervios que inervan la vagina y el clítoris humanos. (Hoyle, 1996).

### 4.2 *Validación del modelo de conejo anestesiado de excitación sexual*

Para traducir los datos de flujo sanguíneo generados utilizando este modelo a los observados en un modelo humano de excitación sexual, se comparó directamente los datos datos de los presente autores con datos de flujo sanguíneo vaginal y cardiovascular generados en estudios preclínicos.

Se ha encontrado que la infusión de VIP tiene los siguientes efectos en el modelo en conejo de excitación sexual:

- El VIP exógeno (bolo intravenoso) induce aumentos dependientes de la concentración significativos del flujo

MADRID

sanguíneo vaginal (véase la figura 2a). Estos aumentos son significativamente elevados por encima de los valores de flujo sanguíneo basal cuando se registran en la pared intra extravaginal. El flujo sanguíneo vaginal aumentó significaticamente en 24,7 ± 3,6 ml/min/100 g de tejido con una administración intravenosa de VIP (3 µg/kg). El flujo sanguíneo permaneció elevado por encima del basal durante alrededor de 11 minutos después de la infusión. Dosis menores indujeron aumentos menores, por ejemplo 0,3 µg/kg elevaron el flujo sanguíneo en 7,5 ± 1,3 ml/min/100 g de tejido y el flujo sanguíneo se elevó durante 7 minutos después de la infusión.

- Las infusiones repetidas de dosis similares de VIP (intravenoso en intervalos de 30 minutos) inducen aumentos reproducibles significativos en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b).

- El VIP (intravenoso) aumenta significativamente el ritmo cardiaco y reduce la presión sanguínea arterial media (véase la figura 3). A 0,3 µg/kg de VIP (intravenoso) se produjo una reducción significativa de la presión sanguínea arterial media de 13,2 ± 0,7 mm Hg y un aumento significativo del ritmo cardiaco de 16 ± 4 latidos por minuto.

[illegible] AN
[illegible] nº 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

Este modelo animal refleja directamente los datos clínicos, es decir, un aumento en el flujo sanguíneo vaginal, una presión sanguínea deprimida y un ritmo cardiaco elevado. Por lo tanto, este modelo puede utilizarse para investigar el (los) mecanismo(s) que subyace(n) a los cambios fisiológicos que aparecen durante la excitación sexual y para validar además los nuevos enfoques de la estimulación del flujo sanguíneo vaginal y por ello del tratamiento de los FSAD.

### 4.3 *Cambios inducidos por el VIP en el flujo sanguíneo vaginal mediante la estimulación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa*

Ottesen y colaboradores demostraron que el VIP induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal y en la lubricación en voluntarias sanas. Sin embargo, el mecanismo por el que el VIP ejerce este efecto no está claro. En la bibliografía hay muchos ejemplos de señalización de VIP mediante diferentes segundos mensajeros, incluyendo cGMP/guanilato ciclasa (Ashur-Fabian, 1999), monóxido de carbono/hemo oxigenasa (Fan, 1998) y cAMP/adenilato ciclasa (Schoeffer, 1985, Gu, 1992, Foda, 1995). Esto se ejemplifica por un reciente artículo que describe cómo los efectos relajantes de VIP en la arteria uterina pueden explicarse por la

13
MADRID
Telf.

liberación de óxido nítrico (Jovanovic, 1998). De forma interesante, existen también evidencias de que NO/cGMP modula el VIP en la función urogenital masculina (Kim, 1994).

En este estudio los presentes autores han mostrado que el VIP induce la vasorrelajación mediante la elevación de los niveles de cAMP intracelular. Realizando una serie de experimentos funcionales se ha medido el flujo sanguíneo y la relajación del músculo liso además de medir bioquímicamente las concentraciones de cAMP intracelular. Se ha utilizado forscolina, un activador de adenilato ciclasa, o un mimético de cAMP, para imitar los efectos de la activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa. El VIP y la forscolina tienen efectos idénticos sobre los efectos fisiológicos de la excitación sobre el flujo sanguíneo vaginal y la relajación.

El VIP (1 µg/kg) y la forscolina (40 nmol/kg) inducen aumentos significativos del flujo sanguíneo vaginal, 13,2 y 12,7 ml/min/100 mg de tejido respectivamente (véase las figuras 2a y 4a). Estos cambios en la amplitud inducida por VIP y forscolina no eran significativamente diferentes. Estos aumentos son significativamente elevados por encima de los valores de flujo sanguíneo basal registrados en la

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. [illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

pared intra- o extravaginal.

El VIP (0,1 µM) y la forscolina (10 µM) aumentaron ambos significativamente las concentraciones intracelulares de cAMP por encima de los niveles basales en tejido vaginal aislado (véase la figura 4b).

El VIP (0,1 µM) y la forscolina (10 µM) elevan las concentraciones basales de 276 nM en un 156% y un 238%, respectivamente. Las diferencias en estos porcentajes reflejan la diferencia de concentraciones de VIP y forscolina utilizados, por ejemplo el VIP a una concentración de 0,1 µM relaja la vagina aislada precontraída aproximadamente un 80%, mientras que la forscolina 10 µM es suficiente para relajar completamente el tejido aislado.

Además, los presentes autores muestran que el VIP y la forscolina inducen la relajación en tejido vaginal aislado con valores de $CE_{50}$ de 18,8 ± 0,6 nM y 320 ± 20 nM respectivamente (véase la figura 4c).

Estos datos establecen que el VIP induce la vasorrelajación vaginal a través de la ruta cAMP/adenilato ciclasa, por ello este modelo puede utilizarse para investigar si la

Teléf. ... MADRID

estimulación del nervio pélvico, es decir la excitación sexual, conduce a la liberación de VIP/activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa. Además, pueden investigarse los enfoques para estimular el flujo sanguíneo vaginal durante la excitación sexual, por ejemplo estimulando directa o indirectamente la señalización de cAMP.

### 4.4 *cAMP es el mediador de la vasorrelajación vaginal*

Los candidatos a neurotransmisor y segundo mensajero responsables de los aumentos del flujo sanguíneo vaginal durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. Hasta la fecha, los investigadores se han centrado en la ruta del óxido nítrico (NO)/cGMP. Según la presente invención, se ha demostrado que: 1) la ruta cAMP/adenilato ciclasa media los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal. 2) el VIP es un neurotransmisor endógeno liberado durante la excitación sexual y 3) el VIP liberado endógenamente induce efectos vasorrelajantes mediante la elevación de los niveles de cAMP.

Los agentes útiles en la presente invención son aquellos que evitan el metabolismo de VIP o que estimulan directamente la señalización de cAMP, potencian los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal, por ejemplo inhibidores de NEP o inhibidores de $\text{PDE}_{cAMP}$, respectivamente (véase la siguiente sección).

En los estudios de los presente autores se ha encontrado que se puede excluir el papel del NO en la relajación vaginal inducida por VIP. A este respecto, hemos mostrado que un potente y selectivo inhibidor de PDE de tipo 5 no tiene efecto sobre los aumentos estimulados por nervio pélvico o inducidos por VIP en el flujo sanguíneo vaginal (-5,3 ± 5,5% de cambio en el flujo sanguíneo a 60 µg/kg). Además, el inhibidor de PDE de tipo 5 tiene un efecto mínimo sobre las relajaciones inducidas por VIP o estimuladas por campo eléctrico (EFS) de músculo liso vaginal aislado (estimulaciones del 30% de relajaciones inducidas por VIP, véase la tabla 1).

Tabla 1: Estimulación de la relajación mediada por VIP de vagina de conejo aislada. Esta tabla ilustra el porcentaje de estimulación de la $\text{CE}_{50}$ para relajaciones mediadas por VIP de músculo liso vaginal precontraído (fenilefrina 1µM). Los inhibidores selectivos de $\text{PDE}_{cAMP}$ de tipos 1, 2, 3 y 4 potenciaron todos significativamente las relajaciones mediadas por VIP, mientras que un inhibidor selectivo de

$PDE_{cAMP}$ de tipo 5 o un control de vehículo no tuvieron efecto sobre las relajaciones mediadas por VIP.

| Inhibidor de PDE a dosis selectiva | Porcentaje de estimulación de la relajación inducida por VIP |
|---|---|
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 1 | 210% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 | 130% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 3 | 220% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 4 | 160% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 5 | Sin efecto (30%) |
| Control de vehículo | Sin efecto |

Los presentes autores han mostrado que el VIP es también el neurotransmisor endógeno NANC (no adrenérgico, no colinérgico) parcialmente responsable de las relajaciones inducidas por EFS de músculo liso vaginal aislado. Una dosis elevada de inhibidor de óxido nítrico sintasa (L-NOARG, 300 μM) inhibe sólo el 50% de las relajaciones inducidas por EFS. Un inhibidor de NEP (1 μM) que evitará el metabolismo de VIP inducido por NEP, y que por lo tanto estimula la señalización de VIP, estimula la relajación NANC, que no depende de óxido nítrico, inducida por EFS.

Han mostrado que tanto NO como VIP regulan el tono del músculo liso de la pared vaginal. Terapéuticamente será posible estimular las relajaciones del músculo liso vaginal con agentes que estimulan la señalización mediada por NO/cGMP y/o VIP/cAMP.

4.5 *El flujo sanguíneo vaginal es estimulado por agentes farmacológicos que elevan directa o indirectamente los niveles de cAMP.*

FSAD está asociado a, y puede dar como resultado, una reducción del flujo sanguíneo vaginal. Los enfoques potenciales para tratar esta enfermedad giran alrededor de la estimulación del flujo sanguíneo vaginal. Habiendo establecido que cAMP es el mediador de la vasorrelajación vaginal y que las elevaciones de cAMP que resultan del VIP liberado neuronalmente, los presentes autores creen que si se estimula la señalización de cAMP, como consecuencia aumentará el flujo sanguíneo vaginal, restableciendo así el flujo sanguíneo vaginal a niveles normales y tratando el FSAD. Hemos elegido inicialmente tres objetivos para estimular directa o indirectamente la vasorrelajación mediada por cAMP: los inhibidores de $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$, inhibidores de NEP (EC 3.4.24.11) y antagonistas de receptor de neuropéptido Y (NPY).

MORENO ... MADRID

### 4.5.1 Inhibidores de endopeptidasa neutra (NEP EC 3.4.24.11)

La NEP EC 3.4.24.11 metaboliza el VIP y por ello finaliza la actividad biológica mediada por VIP. Los inhibidores de NEP potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del VIP liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No ha habido informes previos en la bibliografía sobre la localización de NEP EC 3.4.24.11 o de su papel funcional en el tejido vaginal o de su papel en la excitación sexual.

Los inhibidores selectivos de NE EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 5). Los presentes autores observan un 53% de potenciación del aumento de pico en el flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas, por ejemplo 4 Hz.

Los inhibidores selectivos de NE EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos inducidos por el VIP del flujo sanguíneo vaginal comparados con los controles de tiempo coincidente. A dosis

MORENO
MAN
113
MADRID
Teléf.

submáximas de VIP (por ejemplo 0,3 µg/kg) hay una potenciación significativa tanto en el aumento del pico (95 ± 6%) como de la prolongación de la duración de la estimulación (alrededor de 140%, desde 7 hasta más de 17 minutos, véase la figura 7). Los inhibidores de NEP prolongan significativamente la duración de la elevación inducida por VIP del flujo sanguíneo vaginal cuando se proporcionan en combinación con una dosis de VIP que produce los aumentos de flujo máximos (aproximadamente un 80% de aumento en una duración de 11 a 20 minutos).

Los inhibidores de NEP a dosis clínicamente relevantes estimulan significativamente las relajaciones inducidas por VIP y mediadas por nervio en tejido aislado. La $CE_{50}$ de VIP se reduce significativamente de 18,8 ± 0,6 nM a 2,9 ± 0,3 nM en presencia de un inhibidor selectivo de NEP (1 µM). El efecto del inhibidor de NEP es dependiente de la concentración.

Se expresan el RNA mensajero y la proteína de NEP EC 3.4.24.11 y se han identificado en vagina humana y de conejo por análisis Northern y Western.

KOCH MORENO
Y ALEMAN
113
MADRID

### 4.5.2 Inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE)

El cAMP es degradado por la PDE hidrolizante de cAMP, es decir, PDE$_{cAMP}$. Los inhibidores de PDE$_{cAMP}$ potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del cAMP liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No hay informes en la bibliografía sobre la localización de PDE$_{cAMP}$ o sobre un papel funcional de estas isoenzimas en tejido vaginal, o de un papel en la excitación sexual. Los presentes autores han mostrado, por perfiles de PDE de vagina humana y de conejo, que están presentes las siguientes isoenzimas de PDE$_{cAMP}$ 1, 2, 3, 4, 7 y 8. Los inhibidores de estas PDE$_{cAMP}$ representan agentes potenciales para estimular el flujo sanguíneo vaginal y/o relajar el músculo liso vaginal.

Un inhibidor selectivo de PDE$_{cAMP}$ de tipo 2 estimuló significativamente la duración del aumento inducido por VIP del pico de flujo sanguíneo vaginal por encima del 100% (medido a una amplitud del 50%, véase la figura 7). El inhibidor selectivo de PDE$_{cAMP}$ de tipo 2 estimuló significativamente el aumento del pico del flujo sanguíneo inducido por estimulación del nervio pélvico

MORENO
AN
113
MADRID
Telf.

(aproximadamente 15 ± 3% [200 µg/kg] a 4 Hz).

Los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ estimulan las relajaciones inducidas por VIP de músculo liso vaginal aislado precontraído (fenilefrina 1 µM, véase la tabla 1). Los inhibidores selectivos de $PDE_{cAMP}$ de tipos 1, 2, 3 y 4 potenciaban todos significativamente las relajaciones mediadas por VIP (210% a 76 nM, 130% a 8 nM, 220% a 3,4 µM y 160% a 686 nM de potenciación de los valores de VIP $CE_{50}$). Estos inhibidores se administraron a dosis que se sabían selectivas para el $PDE_{cAMP}$ de interés. El inhibidor selectivo de $PDE_{cGMP}$ de tipo 5 o el control de vehículo no tenían un efecto viable en las relajaciones mediadas por VIP.

### 4.5.3 Antagonistas del receptor de NPY Y1

El NPY ejerce una influencia inhibitoria sobre la vasorrelajación mediada por VIP y los antagonistas del receptor de NPY Y1 facilitarán el efecto vasorrelajante del VIP endógeno liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No existen informes en la bibliografía sobre la localización del receptor de NPY o de un papel funcional

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
113
MADRID

173

para estos receptores en tejido vaginal o un papel en la excitación sexual.

Los estudios de expresión del receptor de NPY han identificado por análisis Northern y Western que los subtipos de receptor de NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$ están presentes en vagina humana y de conejo.

4.6 *Efectos de los agentes que estimulan cAMP o que aumentan el flujo sanguíneo vaginal sobre la presión sanguínea arterial media en conejo anestesiado.*

En la búsqueda de una terapia oral para FSAD, es deseable que no haya efectos cardiovasculares adversos asociados, por ejemplo efectos sobre la presión sanguínea o sobre el ritmo cardiaco. En los estudios de los presentes autores se ha encontrado que las infusiones de VIP reducen significativamente la presión sanguínea arterial media (véase la figura 3) y aumentan significativamente el ritmo cardiaco. Por ello, en un agente altamente preferido, el agente no es VIP. La estimulación del nervio pélvico y los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ y de NEP, sin embargo, no tuvieron efecto sobre la presión sanguínea. A 0,3 µg/kg (intravenoso), el VIP produjo un aumento significativo del ritmo cardiaco de 16 ± 4 latidos por minuto. A dosis

[illegible] MARENO [illegible] MAN [illegible] 113 [illegible] MADRID

mayores tal como 3,0 µg/kg (intravenoso), el VIP produjo una reducción significativa en la presión sanguínea arterial media de 14,7 ± 1,37 mm Hg y esto se asoció a un aumento significativo del ritmo cardiaco de 111 ± 30 latidos por minuto, lo que aumentó entonces la presión sanguínea arterial media a 8,5 ± 1,4 mm Hg.

COMPUESTOS ENSAYADOS

La figura 8 presente una serie de los compuestos que se ensayaron según la presente invención y se encontraron eficaces según la presente invención, es decir, pueden actuar como $P_{cAMP}$ para tratar FSD, en particular FSAD.

Más detalladamente:

El compuesto de fórmula Ia ("FI") es 5-[4-(dietilamino)bencil]-1-metil-3-propil-6,7-dihidro-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona. El FIa puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0911333 (ejemplo 50 de éste).

El compuesto de fórmula II ("FII") es 9-(1-acetil-4-feinlbutil)-2-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona. El FII puede prepararse según las

[illegible] BACH MORENO
[illegible] ALEMAN
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

explicaciones del documento EP-A-0771799 (ejemplo 100 de éste).

El compuesto de fórmula III ("FIII") es milrinone. El FIII es un producto comercialmente disponible.

El compuesto de fórmula IV ("FIV") es rolipram. El FIV es un producto comercialmente disponible.

El compuesto de fórmula V ("FV") es éster 3-[[[1-(2-carboxi-4-pentenil)ciclopentil]carbonil]amino]-1-etílico del ácido ciclohexanocarboxílico. El FV puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0274234 (ejemplo 300 de éste).

El compuesto de fórmula VI ("FVI") es éster 3-[[[1-(2-carboxi-4-pentenil)ciclopentil]carbonil]amino] del ácido ciclohexanocarboxílico. El FVI puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0274234 (ejemplo 379 de éste).

En particular, los compuestos FIa, FII, FIII y FIV son inhibidores de $PDE_{cAMP}$. FIa es un I:PDEI, FII es un I:PDEII, FIII es un I:PDEIII y FIV es un I:PDEIV.

MORENO
AN
113
ADRID
Teléf.

Los datos para estos compuestos se presentan anteriormente en las secciones de ejemplos anteriores, por ejemplo véase la tabla 1.

Como resulta evidente, estos inhibidores de $PDE_{cAMP}$ estimulan las relajaciones inducidas por VIP de tejido aislado.

El FII, que es un I:PDEII selectivo, estimula los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relevantes.

El FII potencia también los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI son inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11.

Los datos presentados anteriormente en las secciones de ejemplos anteriores son para el FVI. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares para el FV.

Como resulta evidente, el FV y el FVI estimulan los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal a

[illegible] MORENO
[illegible] Y [illegible] MAN
[illegible], 113
[illegible] MADRID
[illegible]

dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI potencian también los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI estimulan también las relajaciones inducidas por VIP y mediadas por el nervio de tejido aislado a dosis clínicamente relevantes.

## CONCLUSIONES

Los presentes autores han desarrollado un modelo animal que imita la respuesta de excitación fisiológica obervada durante la excitación sexual femenina y que refleja directamente los datos clínicos obtenidos en voluntarias humanas. El modelo utiliza tecnologías de láser Doppler para registrar pequeños cambios en el flujo sanguíneo vaginal inducidos por la estimulación del nervio pélvico o por neurotransmisores vasoactivos. Durante la excitación sexual, existe un aumento del flujo sanguíneo genital resultante del aumento de inervación del nervio pélvico. El aumento estimulado por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal observado en el modelo animal representa

MORENO
ALEMAN
13
MADRID

los efectos vasculares endógenos observados durante la excitación sexual femenina. Por lo tanto, este modelo puede utilizarse en primer lugar para identificar los mecanismos implicados en la regulación del flujo sanguíneo vaginal y, en segundo lugar, para validar nuevos enfoques para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal.

Este estudio ha utilizado exitosamente una combinación de técnicas in vivo, in vitro y bioquímicas para identificar al cAMP como el mediador/segundo mensajero que regula la vasorrelajación vaginal (y la relajación de la pared vaginal). Utilizando este modelo animal, se ha demostrado que los aumentos del flujo sanguíneo vaginal mediados por VIP son el resultado de la elevación del cAMP del tejido, mientras que anteriormente se había mostrado que el VIP aumentaba el flujo sanguíneo vaginal en voluntarias sanas, pero el mecanismo celular no estaba identificado. Además, se ha demostrado que el flujo sanguíneo vaginal puede estimularse directamente con un mimético de cAMP o indirectamente elevando las concentraciones de cAMP.

La causa principal de los FSAD es una reducción del flujo sanguíneo genital y esta se manifiesta como una reducción de la congestión vaginal, labial y clitorídea. El tratamiento de mujeres con FSAD es factible restableciendo

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 13
[illegible] DRID

la respuesta de excitación sexual normal. Esto puede conseguirse estimulando el flujo sanguíneo genital. El enfoque de los presentes autores para el tratamiento de los FSAD será estimular el flujo sanguíneo vaginal/lubricación por potenciación directa o indirecta de la señalización de cAMP endógeno, por ejemplo con un inhibidor de NEP (EC 3.4.24.11), o inhibidores de PDE hidrolizantes de cAMP. Esto tendrá el efecto genérico de restablecer o imitar la respuesta de excitación normal sin efectos secundarios cardiovasculares. Se potenciará la excitación sexual/congestión, más que inducirla simplemente en ausencia de estímulo sexual, que puede ser el caso con algunos agentes vasoactivos administrados exógenamente, por ejemplo el VIP.

Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente como referencia. Diversas modificaciones y variaciones de los procedimientos y del sistema descritos en la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin salirse del alcance y espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención se describe en conexión con realizaciones preferidas específicas, debe comprenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. Es más,

MORENO
MAN
113
ADRID
Telé

están previstas diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en bioquímica y biotecnología o campos relacionados, dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

## REFERENCIAS DEL TEXTO GENERAL

Ashur-Fabian, O., Perl. O., Lilling. G., et al., (1999) SNV, a lipophilic superactive VIP analogue, acts through cGMP to promote neuronal survival. *Peptides*, 20, 629-633.

Berman, J.R., Berman, L. & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: Incidence, pathophysiology, evaluation and treatment options. *Urology*, 54, 385-391.

Berman, J., Goldstein, I., Werbin, T. et al., (1999a). Double blind placebo controlled study with crossover to assess effect of sildenafil on physiological parameters of the females sexual response. *J. Urol.*, 161, 805.

*Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV*, American Psychiatric Association, Washington DC. 1987, pág. 493-518.

MORENO
Y MAN
c. 113
Teléf. MADRID

Fan, Y.P., Chakder, S. & Ratton, S. (1999). Inhibitory effect of zinc protoporhyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal polypeptide and other receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 285, 468-474.

Foda, H.D., Sharaf, H.H., Absood, A. et al. (1995). Pituitary adenilate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides*, 16, 1057-1061.

Frank, E., Anderson, C. & Rubinstein, D. (1978). Frequency of sexual dysfunction in "normal" couples. *N. Engl. J. Med.*, 229, 111-115.

Goldstein, I. & Berman, J.R: (1998). Vasculogenic female sexual dysfunction: vaginal engorgement and clitoral erectile insufficiency syndromes. *Int. J. Impot. Res.*, 10, S84-S90.

Gu, Z.F., Jensen, R.T. & Matton, P.N. (1992). A primary role for protein kinase A in smooth muscle relaxation induced by adrenergic agonists and neuropeptides. *Am. J. Physiol.*, 263, G360-G364.

[illegible] MORENO
[illegible] VAN
[illegible] 113
[illegible] RID

Hoyle, C.H.V., Stones, R.W., Robson, T. et al. (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide containing nerves. *J. Anat.*, 188, 633-644.

Ingenhoven, N. & Beck-Sickinger, A.G. (1997). Fluorescent labelled analogues of neuropeptide Y for the characterisation of cells expressing NPY receptor subtypes. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, 17, 407-418.

Jovanovic, A., Jovanovic, S., Tulic, I. et al (1998). Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Human. Reprod.*, 4, 71-76.

Kaplan, H.S. (1974). The New Sex Therapy. Londres. Bailliere Tindall.

Kaplan, S.A., Reis, R.B., Kohm, I.J. et al. (1999). Safety and efficacy of sildenafil in postmenopausal women with sexual dysfunction. *Urology*, 53, 481-486.

Kim, Y.C., Choi, H.K., Ahn, Y.S., et al. (1994). The effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on rabbit cavernosal smooth muscle contractility. *J. Androl.*, 15,

113
MADRID

392-739.

Laan, E. & Everaerd, W. (1988). Physiological measures of vaginal vasocongestion. *Int. J. Impot. Res.*, 10, S107-S110.

Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, 10, S104-S106.

Levin, R.J. (1980). The physiology of sexual function in women. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 7, 213-252.

Levin, R.J. (1991). VIP, vagina, clitoral and preurethral glans: An update on female genital arousal. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 98, 61-69.

Levin, R.J. (1992). The mechanisms of human females sexual arousal. *Ann. Rev. Sex. Res.*, 3, 1-48.

Levin, R.J. & Wagner, G. (1986). TRH and vaginal blood flow-effects in conscious women and anaesthetised sheep. *J. Physiol.*, 373, 83p.

Lunberg, J.M., Modin, A. & Malmstrom, R.E. (1996), Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists.

[illegible] MORENO
[illegible] Y [illegible] MAN
c/. [illegible], 113
Telf. [illegible] MADRID

*Trends Pharmacol. Sci.*, 17, 301-304.

Masters, W.H., Johnson, V.E. *Human Sexual Response*, Little, Brown: Boston, 1996.

Ottesen, B., Gerstenberg, T., Ulrichsen, H. et al. (1983). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases vaginal blood flow and inhibits smooth muscle activity in women. *Eur. J. Clin. Invest.*, 13, 321-324.

Ottesen, B., Wagner, G. & Fahrenkrug, J. *Peptide innervation of the sexual organs*. En: Handbook of Sexology, vol. 6, The Pharmacological and Endocrinology of Sexual Function, Sitsen, J.M.A. (ed). Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1988), capítulo 4, pág. 66-97.

Ottensen, B., Pedersen, B., Nielsen, J. et al. (1987). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides*, 8, 797-800.

Park, K., Goldstein, I., Andry, C., et al (1997). Vasculogenic female sexual dysfunction: the hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. *Int. Impotence Res.*, 9, 27-37.

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
Teléf. [illegible]

185

Rosen, R., Taylor, J., Leiblum, S. et al. (1993). Prevalence of sexual dysfunction in women: results of a survey of 329 women in an outpatient gynecological clinic. *J. Sex. Marital. Ther.*, 19, 171-188

Schiavi, R.C. & Seagraves, R.T. (1995). The biology of sexual function. *Psychiat. Clin. North. Am.*, 18, 7-23.

Schoeffter, P. & Stoclet, J.C. (1985). Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 109, 275-279.

Serradeil-Le Gal, C., Valette, G. Rouby, P.E. et al. (1995). SR 120819A, an orally active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Letters*, 3, 192-196.

Sjoberg, I. (1992). The vagina: Morphological, functional and ecological aspects. *Acta Obst. Gynecol. Scand.*, 71, 84-85.

Spector, I.P. & Carey, M.P. (1990). Incidence and prevalence of sexual dysfunctions: a critical review of empirical literature. *Arch. Sex. Behav.*, 19, 389-408.

[illegible]

Wagner, G. (1992). Aspects of genital physiology and pathology. *Sem. Neurol.*, 12, 87-97.

Werbin, T., Salimpour, P., Berman, L, et al (1999). Effect of sexual stimulation and age on genital blood flow in women with sexual stimulation. *J. Urol.*, 161, 688.

Wincze, J.P., Albert, A. & Bansál, S. (1993). Sexual arousal in diábetic females: Physiological and self-report measures. *Arch. Sex Behav.*, 22, 587-601.

Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M. et al (1995). Subtype selectivity and antagonist profile of nonpeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275, 143-9.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION PDE

1. Han, P., Fletcher, C.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Yaremko, L.M., Michaeli, T. Assignemt of the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3 and of the human PDE7A gene to chromosome 8q13. Genomics 48: 275-276, 1998.

2. Michaeli, T., Bloom, T.J., Martins. T., Loughney, K.,

[illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

Ferguson, K., Riggs, M., Rodgers, L. Beavo, J.A., Wigler, M.: Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phophodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem., 268: 12925-12932, 1993.

3. Milatovich, A., Bolger, G., Michaeli, T., Francke, U.: Chromosome localization of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse. Somat. Cell. Molec. Genet. 20:75-86, 1994.

4. Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K., Loughney, K.: Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3-prime, 5-prime-cyclic nucleotide phophodiesterase. Gene 191: 89-95, 1997.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NEP

1. Barker, P.E., Shipp, M.A., D'Adamio, L., Masteller, E.L., Reinherz, E.L. The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3(q21-q27). J. Immun. 142:283-287, 1989.

2. D'Adamio, L., Shipp, M.A., Masteller, E.L., Reinherz,

MORENO
AN
113
MADRID

E.L.: Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5-prime untranslated regions. Proc. Nat. Acad. Sci. 86:7103-7107, 1989.

3. Letarte, M., Vera, S., Tran, R., Addis, J.B.L., Onizuka, R.J., Quackenbush, E.J., Jongheel, C.V., McInnes, R.R:: Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. J. Exp. Med. 168:1247-1253, 1988.

4. Shipp, M.A., Vijayaraghavan, J., Schmidt, E.V., Masteller, E.L., D'Adamio, L., Hersh, L.B., Reinherz, E.L.: Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. 86:297-301, 1989.

5. Tran-Paterson, R., Willard, H.F., Letarte, M.: The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 3.4.24.11) gene is located on human cromosome 3. Cancer Genet. Cytogenetic. 42:129-134, 1989.

MORENO
AN
113
MADRID
Tel.

189

REFERENCIAS PARA LA SECCION NPY

1. Allen, J.M., Bloom, S.R.: Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8:1-8, 1986.

2. Bahary, N., Zorich, G., Pachter, J.E., Leibel, R.L., Friedman, J.M.: Molecular genetic linkage maps of mouse chromosomes 4 and 6. Genomics 11:33-47, 1991.

3. Baker, E., Hort, Y.J., Ball, H., Sutherland, G.R., Shine, J., Herzog, H.: Assignment of the human neuropeptide Y gene to chromosome 7p15.1 by nonisotopic in situ hybridization. Genomics 26:163-164, 1995.

5. Carr, L.G., Foroud, T., Bice, P., Gobbert, T., Ivashina, J., Edenberg, H., Lumeng. L., Li, T.K.: A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. Alcohol Clin. Exp. Res. 22:884-887, 1998.

5. Dockray, G.J.: Neuropeptide Y: in search of a function. Neurochem. Int. 8:9-11, 1986.

6. Erickson, J.C., Clegg., K.E., Palmiter, R.D.: Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. Nature 381: 415-421, 1996.

[illegible] RENO
[illegible] AN
ING [illegible]
[illegible] RID
Tel. [illegible]

PubMed ID: 8632796.

7. Erickson, J.C., Hollopeter, G., Palmiter, R.D.: Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274: 1704-1706, 1996.

8. Karvonen, M.K., Pesonen, U., Koulu, M., Niskanen, L., Laakso, M., Rissanen, A., Dekker, J.M., t'Hart, L.M., Valve, R., Uusitupa, M.I.: Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. Nature Med. 4:1434-1437, 1998.

9. Maccarrone, C., Jarrott., B.; Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8:13-22, 1986.

10. Meisler, M.H., Spence, J.E., Dixon, J.E., Caldwell, R.M., Minth, C.D., Beaudet, A.L.: Exclusion of close linkage between the loci for cystic fibrosis and neuropeptide Y on human cromosome 7. Cytogenet. Cell Genet. 44:175-176, 1987.

11. Minth, C.D., Andrews, P.C., Dixon, J.E.: Characterization, sequence and expression of the cloned human neuropeptide Y gene. J. Biol. Chem. 261:11974-11979,

[illegible] MORENO
[illegible] nº 113
[illegible] MADRID

191

1986.

12. Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M., Dixon, J.E.: Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptidase tyrosine. Proc. Nat. Acad. Sci. 81:4577-4581, 1984.

13. Takeuchi, T., Gumucio, D., Eddy, R., Meisler, M., Minth, C. Dixon, J., Yamada, T., Shows, T.: Assignment of the related pancreatic polypeptide (PPY) and neuropeptide Y (NPY) genes to regions on human chromosomes 17 and 7. (Resumen) Cytogenet. Cell. Genet. 40:759 sólo, 1985.

14. Takeuchi, T., Gumucio, D.L., Yamada, T., Meisler, M.H., Minth, C.D., Dixon, J.E., Eddy, R.E., Shows, T.B.: Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. J. Clin. Invest. 77:1038-1041, 1986.

15. Terenghi, G., Polak, J.M., Hamid, Q., O'Brien, E., Denny, P., Legon, S., Dixon, J., Minth, C.D., Palay, S.L., Yasargil, G., Chan-Palay, V.: Localization of neuropeptide Y mRNA in neurons of human cerebral cortex by means of in situ hybridization with a complementary RNA probe. Proc. Nat. Acad. Sci. 84:7315-7318, 1987.

AN
113
MADRID

16. Thiele, T.E., Marsh, D.J., Ste. Marie, L., Bernstein, O.L., Palmiter, R.D.: Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. Nature 396:366-369, 1998.

17. Uusitupa, M.I.J., Karvonen, M.K., Pesonen, U., Koulu, M.: Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism. Ann. Med. 30:508-510, 1998.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPYR1

1. Herzog, H., Baumgartner, M., Vivero, C., Selbie, L.A., Auer, B., Shine, J.: Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor. J. Biol. Chem. 268:6703-6707, 1993.

2. Herzog, H., Darby, K., Ball, H., Hort, Y., Beck-Sickinger, A., Shine, J.: Overlapping gene stucture of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests coordinate transcriptional regulation, Genomics 41:315-319, 1997.

3. Herzog, H., Hort, Y.J., Ball, H.J., Hayes, G., Shine,

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible]DRID

J., Selbie, L.A.: Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. Proc. Nat. Acad. Sci. 89:5974-5798, 1992.

4. Larhammar, D., Blomqvist, A.G., Yee, F., Jazin, E., Yoo, H., Whalestedt, C.: Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. J. Biol. Chem. 267:10935-10938, 1992.

5. Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson, D.A.: Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41:498-500, 1997.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPYR2

1. Ammar, D.A., Eadie, D.M., Wong, D.J., Ma, Y.-Y., Kolakowski, L.F. Jr., Yang-Feng, T.L., Thompson, D.A.: Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide Y receptor gene. Genomics 38:392-398, 1996.

2. Gerald, C., Walker, M.W., Vaysse, P., J.-J., He, C., Brancheck, T.A., Weinsahnk, R.L.: Expression cloning and

pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. J. Biol. Chem. 270: 26758-26761, 1995.

3. Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson, D.A.: Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

4. Rose, P.M., Fernandes, P., Lynch, J.S., Frazier, S.T., Fisher, S.M., Kodukula, K., Kienzle, B., Seethala, R.: Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. J. Biol. Chem. 270:22661-22664, 1995.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VIP

1. Bodner, M., Fridkin, M. Gozes, I.: Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3548-3551, 1985.

2. Gotoh, E., Yamagami, T., Yamamoto, H., Okamoto, H.: Chromosomal assignment of human VIP/PHM-27 gene to 6q26-q27 region by spot blot hybridization and in situ

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 13
MADRID
Tele. [illegible]

hybridization. Biochem. Int. 17:555-562, 1988.

3. Gozes, I., Avidor, R., Yahav, Y., Katznelson, D. Croce, C.M., Huebner, K.: The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21-6qter. Hum. Genet. 75:41-44, 1987.

4. Gozes, I., Nakai, H., Byers, M., Avidor, R., Weinstein, Y., Shani, Y., Shows, T.B.: Sequential expression in the nervous system of C-MYB and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24. Somat. Cell. Molec. Genet. 13:305-313, 1987.

5. Heinz-Erian, P., Dey. R.D., Flux, M. Said, S.I.: Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. Science 229: 1407-1408, 1985.

6. Itoh, N., Obata, K., Yanaihara, N., Okamoto, H.: Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature 304:547-549, 1983.

7. Linder, S., Barkhem, T., Norberg, A., Persson, H., Schalling, M., Hokfelt, T., Magnusson, G.: Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal

MORENO
MAN
113
MADRID
Teléf.

peptide precursor. Proc. Nat. Acad. Sci. 84:605-609, 1987.

8. Omary, M.B., Kagnoff, M.F.: Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line. Science 238: 1578-1581, 1987.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION AC

1. Parma, J., Stengel, D., Gannage, M.-H., Poyard, M., Barouki, R., Hanoune, J.: Sequence of a human brain adenylyl cyclase partial cDNA: evidence for a consensus cyclase domain. Biochem. Biophys. Rs. Commun. 179:455-462, 1991.

2. Stengel, D., Parma, J., Gannage, M.-H., Roeckel, N., Mattei, M.-G., Barouki, R., Hanoune, J.: Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. Hum. Genet. 90:126-130, 1992.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VPAC1

1. Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Darmoul, D., Maoret, J.-J., Carrero, I., Ogier-Denis, E., Laburthe, M.: Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNS encoding proteins with different N-terminal

domains. Biochem. Biopys. Res. Commun. 200:769-776, 1994.

2. Hashimoto, H., Nishino, A., Shintani, N., Hagihara, N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Yamamoto, K., Matsuda, T., Ishihara, T., Nagata, S., Baba, A.: Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VPAC-1) receptor. Genomics 58:90-93, 1999.

3. Libert, F., Passage, E., Parmentier, M., Simons, M.-J., Vassart, G., Mattei, M.-G., Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonine receptor. Genomics 11: 225-227, 1991.

4. Sreedharan, S.P., Huang, J.-X., Cheung, M.-C., Goetzl, E.J.: Structure, expression and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. Proc. Nat. Acad. Sci. 92:2939-2943, 1995.

5. Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Huang, J.-X., Goetzl, E.J.: Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193:546-553, 1993.

6. Sreedharan, S.P., Robichon, A., Peterson, K.E., Goetzl, E.J.: Cloning and expression of the human vasoactive

...SENO ...AN ...113 ...ADRID Teléf.

intestinal peptide receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. 88:4986-4990, 1991.

7. Vassart, G.: Personal Communication. Bruselas, Bélgica, 1-15-1992.

8. Wenger, G.D.: Personal Communication, Columbus, Ohio, 8-3-1993.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VPAC2

1. Adamou, J.E., Aiyar, N., Van Horn, S., Elshourbagy, N.A.: Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 209:385-392, 1995.

2. MacKay, M., Fantes, J., Scherer, S., Boyle, S., West, K., Tsui, L.-C., Belloni, E., Lutz, E., Van Heyningen, V., Harmar, A.J.: Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. Genomics 37:345-353, 1996.

3. Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., Goosens, J.-F., De Neef, P., Waelbroeck, M. Robberecht, P.:

[illegible] MORENO
[illegible] AN
ING [illegible] 15
[illegible] MADRID
Telef. [illegible]

Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochem. Biophy. Res. Commun. 205:1617-1624, 1994.

## LISTADO DE SECUENCIAS

### 1. NEP (EC 3.4.24.11)

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSMRNAEN 3181 pb mRNA PRI 12-sep-1993 |
| DEFINICION | mRNA humano para encefalinasa (EC 3.4.24.11) |
| ACCESO | X07166 |
| NID | g34757 |
| VERSION | X07166.1 GI: 34757 |
| PALABRAS CLAVE | encefalinasa, metaloproteína, endopeptidasa neutra |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 3181) |
| AUTORES | Malfroy, B., Kuang, W.J., Seeburg, P.H., Mason, A.J. y Schofield, P.R. |
| TITULO | Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). |
| REVISTA | FEBS. Lett. 229 (1), 206-210 (1998) |
| MEDLINE | 88152222 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |

ADRID
Telef.

201

```
source          1...3181
                /organism="Homo sapiens"
                /db_xref="taxon:9606"
                /tissue_type="placenta"
                /clone_lib="lambda gt10"
                /clone="lambda H7"
CDS             18..2249
                /note="enkephalinase (AA 1-743)"
                /codon_start=1
                /protein_id="CAA30157.1"
                /db_xref="PID:g34758"
                /db_xref="GI:34758"
                /db_xref="SWISS-PROT:P08473"
                /translation="MDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYAT
                YDDGICKSSDCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKYACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDI
                LRDELEVVLKDVLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINESAIDSRGGEPLLKLLPDIYGW
                PVATENWEQKYGASWTAEKAIAQLNSKYGKKVLINLFVGTDDKNSVNHVIHIDQPRLG
                LPSRDYYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDENQLALEMNKVMELEKEI
                ANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSLEINGKPFSWLNFTNEIMSTVNISITNE
                EDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTYKESRNAFRKALY
                GTTSETATWRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDD
                LTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNKLNNEYLELNYKEDEYFENIIQNL
                KFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSL
                NYGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSASNFKEQSQCMVYQYGNFSW
                DLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLGQAYRAYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQLFFLN
                FAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEKKC
                RVW"

misc_feature    3073..3078
                /note="poly A signal"

RECUENTO DE BASES  1055 a, 582 c, 657 g, 887 t

ORIGEN

      1 gcaagtcaga aagtcagatg gatataactg atatcaacac tccaaagcca aagaagaaac
     61 agcgatggac tccactggag atcagcctct cggtccttgt cctgctcctc accatcatag
    121 ctgtgacaat gatcgcactc tatgcaacct acgatgatgg tatttgcaag tcatcagact
    181 gcataaaatc agctgctcga ctgatccaaa acatggatgc caccactgag ccttgtacag
```

FATIMA ... ...AN
ING... ... 113
... MADRID
Telf.

```
 241 actttttcaa atatgcttgc ggaggctggt tgaaacgtaa tgtcattccc gagaccagct
 301 ccagttacgg caactttgac attttaagag atgaactaga agtcgttttg aaagatgtcc
 361 ttcaagaacc caaaactgaa gatatagtag cagtgcagaa agcaaaagca ttgtacaggt
 421 cttgtataaa tgaatctgct attgatagca gaggtggaga acctctactc aaactgttac
 481 cagacatata tgggtggcca gtagcaacag aaaactggga gcaaaaatat ggtgcttctt
 541 ggacagctga aaaagctatt gcacaactga attctaaata tggaaaaaaa gtccttatta
 601 atttgtttgt tggcactgat gataagaatt ctgtgaatca tgtaattcat attgaccaac
 661 ctcgacttgg cctcccttct agagattact atgaatgcac tggaatctat aaagaggctt
 721 gtacagcata tgtggatttt atgatttctg tggccagatt gattcgtcag gaagaaagat
 781 tgcccatcga tgaaaaccag cttgctttgg aaatgaataa agttatggaa ttggaaaaag
 841 aaattgccaa tgctacggct aaacctgaag atcgaaatga tccaatgctt ctgtataaca
 901 agatgacatt ggcccagatc caaaataact tttcactaga gatcaatggg aagccattca
 961 gctggttgaa tttcacaaat gaaatcatgt caactgtgaa tattagtatt acaaatgagg
1021 aagatgtggt tgtttatgct ccagaatatt taaccaaact taagcccatt cttaccaaat
1081 atttctgccg agatcttcaa aatttaatgt cctggagatt cataatggat cttgtaagca
1141 gcctcagccg aacctacaag gagtccagaa atgctttccg caaggccctt tatggtacaa
1201 cctcagaaac agcaacttgg agacgttgtg caaactatgt caatgggaat atggaaaatg
1261 ctgtggggag gctttatgtg gaagcagcat ttgctggaga gagtaaacat gtggtcgagg
1321 atttgattgc acagatccga gaagttttta ttcagacttt agatgacctc acttggatgg
1381 atgccgagac aaaaaagaga gctgaagaaa aggccttagc aattaaagaa aggatcggct
1441 atcctgatga cattgtttca aatgataaca aactgaataa tgagtacctc gagttgaact
1501 acaaagaaga tgaatacttc gagaacataa ttcaaaattt gaaattcagc caaagtaaac
1561 aactgaagaa gctccgagaa aaggtggaca aagatgagtg gataagtgga gcagctgtag
1621 tcaatgcatt ttactcttca ggaagaaatc agatagtctt cccagccggc attctgcagc
1681 ccccctcttt tagtgcccag cagtccaact cattgaacta tgggggcatc ggcatggtca
1741 taggacacga aatcacccat ggcttcgatg acaatggcag aaactttaac aaagatggag
1801 acctcgttga ctggtggact caacagtctg caagtaactt taaggagcaa tcccagtgca
1861 tggtgtatca gtatggaaac ttttcctggg acctggcagg tggacagcac cttaatggaa
1921 ttaatacact gggagaaaac attgctgata atggaggtct tggtcaagca tacagagcct
1981 atcagaatta tattaaaaag aatggcgaag aaaaattact tcctggactt gacctaaatc
2041 acaaacaact atttttcttg aactttgcac aggtgtggtg tggaacctat aggccagagt
2101 atgcggttaa ctccattaaa acagatgtgc acagtccagg caatttcagg attattggga
2161 ctttgcagaa ctctgcagag ttttcagaag cctttcactg ccgcaagaat tcatacatga
2221 atccagaaaa gaagtgccgg gtttggtgat cttcaaaaga agcattgcag cccttggcta
2281 gacttgccaa caccacagaa atggggaatt ctctaatcga aagaaaatgg gccctagggg
2341 tcactgtact gacttgaggg tgattaacag agagggcacc atcacaatac agataacatt
2401 aggttgtcct agaaagggtg tggagggagg aagggggtct aaggtctatc aagtcaatca
2461 tttctcactg tgtacataat gcttaatttc taaagataat attactgttt atttctgttt
2521 ctcatatggt ctaccagttt gctgatgtcc ctagaaaaca atgcaaaacc tttgaggtag
2581 accaggattt ctaatcaaaa gggaaaagaa gatgttgaag aatacagtta ggcaccagaa
2641 gaacagtagg tgacactata gtttaaaaca cattgcctaa ctactagttt ttacttttat
2701 ttgcaacatt tacagtcctt caaaatcctt ccaaagaatt cttatacaca ttggggcctt
2761 ggagcttaca tagttttaaa ctcatttttg ccatacatca gttattcatt ctgtgatcat
2821 ttattttaag cactcttaaa gcaaaaaatg aatgtctaaa attgtttttt gttgtacctg
2881 ctttgactga tgctgagatt cttcaggctt cctgcaattt tctaagcaat ttcttgctct
2941 atctttcaaa acttggtatt tttcagagat ttatataaat gtaaaaataa taatttttat
3001 atttaattat taactacatt tatgagtaac tattattata ggtaatcaat gaatattgaa
3061 gtttcagctt aaaataaaca gttgtgaacc aagatctata aagcgatata cagatgaaaa
3121 tttgagacta tttaaactta taaatcatat tgatgaaaag atttaagcac aaactttagg
3181 g
```

2. **PDE de tipo 1**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSPDE1A3A 2008 pb mRNA PRI 12-abr-1996 |
| DEFINICION | mRNA de fosfodiesterasa de nucleótidos 3',5'-cíclicos humana (HSPDE1A3A), cd completo. |
| ACCESO | U40370 |
| NID | g1151108 |
| VERSION | U40370.1 GI: 1151108 |
| PALABRAS CLAVE | fosfodiesterasa estimulada por calmodulina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 2008) |
| AUTORES | Loughney, K., Martins., T.J., Harris, E.A., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., y Ferguson, K. |
| TITULO | Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterases |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 271 (2), 796-806 (1996) |
| MEDLINE | 96132810 |

AN
RID

REFERENCIA 2 (bases 1 a 2008)

AUTORES Loughney, K., Martins., T.J., Harris, E.A.S., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., y Ferguson, K.

TITULO Envío directo

REVISTA Enviado el 7 de noviembre de 1995. Kate Loughney, ICOS, 22021 20th Ave. S.E., Bothell, WA 98021, EE.UU.

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

```
source          1...2008
            /organism="Homo sapiens"
            /db_xref="taxon:9606"
  gene      85..1692
            /gene="PDE1A"
  CDS       85..1692
            /gene="PDE1A"
            /note="PDE1A3; type I phosphodiesterase"
            /codon_start=1
            /product="3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase"
            /protein_id="AAC50436.1"
            /db_xref="PID:g1151109"
            /db_xref="GI:1151109"
            /translation="MGSSATEIEELENTTFKYLTGEQTEKMWQRLKGILRCLVKQLER
            GDVNVVDLKKNIEYAASVLEAVYIDETRRLLDTEDELSDIQTDSVPSEVRDWLASTFT
            RKMGMTKKKPEEKPKFRSIVHAVQAGIFVERMYRKTYHMVGLAYPAAVIVTLKDVDKW
            SFDVFALNEASGEHSLKFMIYELFTRYDLINRFKIPVSCLITFAEALEVGYSKYKNPY
            HNLIHAADVTQTVHYIMLHTGIMHWLTELEILAMVFAAAIHDYEHTGTTNNFHIQTRS
            DVAILYNDRSVLENHHVSAAYRLMQEEEMNILINLSKDDWRDLRNLVIEMVLSTDMSG
            HFQQIKNIRNSLQQPEGIDRAKTMSLILHAADISHPAKSWKLHYRWTMALMEEFFLQG
            DKEAELGLPFSPLCDRKSTMVAQSQIGFIDFIVEPTFSLLTDSTEKIVIPLIEEASKA
            ETSSYVASSSTTIVGLHIADALRRSNTKGSMSDGSYSPDYSLAAVDLKSFKNNLVDII
            QQNKERWKELAAQEARTSSQKCEFIHQ"
```

RECUENTO DE BASES 627 a, 400 c, 437 g, 544 t

205

ORIGEN

```
   1 gaattctgat gtgcttcagt gcacagaaca gtaacagatg agctgctttt ggggagagct
  61 tgagtactca gtcggagcat catcatgggg tctagtgcca cagagattga agaattggaa
 121 aacaccactt ttaagtatct tacaggagaa cagactgaaa aaatgtggca gcgcctgaaa
 181 ggaatactaa gatgcttggt gaagcagctg gaaagaggtg atgttaacgt cgtcgactta
 241 aagaagaata ttgaatatgc ggcatctgtg ctggaagcag tttatatcga tgaaacaaga
 301 agacttctgg atactgaaga tgagctcagt gacattcaga ctgactcagt cccatctgaa
 361 gtcccggact ggttggcttc tacctttaca cggaaaatgg ggatgacaaa aaagaaacct
 421 gaggaaaaac caaaatttcg gagcattgtg catgctgttc aagctggaat ttttgtggaa
 481 agaatgtacc gaaaaacata tcatatggtt ggtttggcat atccagcagc tgtcatcgta
 541 acattaaagg atgttgataa atggtctttc gatgtatttg ccctaaatga agcaagtgga
 601 gagcatagtc tgaagtttat gatttatgaa ctgtttacca gatatgatct tatcaaccgt

 661 ttcaagattc ctgtttcttg cctaattacc tttgcagaag ctttagaagt tggttacagc
 721 aagtacaaaa atccatatca caatttgatt catgcagctg atgtcactca aactgtgcat
 781 tacataatgc ttcatacagg tatcatgcac tggctcactg aactggaaat tttagcaatg
 841 gtctttgctg ctgccattca tgattatgag catacaggga caacaaacaa ctttcacatt
 901 cagacaaggt cagatgttgc catttgtgat aatgatcgct ctgtccttga gaatcaccac
 961 gtgagtgcag cttatcgact tatgcaagaa gaagaaatga atatcttgat aaatttatcc
1021 aaagatgact ggagggatct tcggaaccta gtgattgaaa tggttttatc tacagacatg
1081 tcaggtcact tccagcaaat taaaaatata agaaacagtt tgcagcagcc tgaagggatt
1141 gacacagcca aaaccatgtc cctgatttct cacgcagcag acatcagcca cccagccaaa
1201 tcctggaagc tgcattatcg gtggaccatg gccctaatgg aggagttttt cctgcaggga
1261 gataaagaag ctgaattagg gcttccattt tccccacttt gtgatcggaa gtcaaccatg
1321 gtggcccagt cacaaatagg tttcatcgat ttcatagtag agccaacatt ttctcttctg
1381 acagactcaa cagagaaaat tgttattcct cttatagagg aagcctcaaa agccgaaact
1441 tcttcctatg tggcaagcag ctcaaccacc attgtggggt tacacattgc tgatgcacta
1501 agacgatcaa atacaaaagg ctccatgagt gatgggtcct attccccaga ctactccctt
1561 gcagcagtgg acctgaagag tttcaagaac aacctggtgg acatcattca gcagaacaaa
1621 gagaggtgga aagagttagc tgcacaagaa gcaagaacca gttcacagaa gtgtgagttt
1681 attcatcagt aaacaccttt aagtaaaacc tcgtgcatgg tggcagctct aatttgacca
1741 aaagacttgg agattttgat tatgcttgct ggaaatctac cctgtcctgt gtgagacagg
1801 aaatctattt ttgcagattg ctcaataagc atcatgagcc acataaataa cagctgtaaa
1861 ctccttaatt caccgggctc aactgctacc gaacagattc atctagtggc tacatcagca
1921 ccttgtgctt tcagatatct gtttcaatgg cattttgtgg catttgtctt taccgagtgc
1981 caataaattt tctttgagca aaaaaaa
```

## 2. PDE de tipo 2

LOCUS HSU67733 4240 pb mRNA PRI 21-may-1997

DEFINICION mRNA de fosfodiesterasa de nucleótidos

| | |
|---|---|
| | 3',5'-cíclicos humana estimulada por cGMP PDE2A3 (PDE2A), cd completo. |
| ACCESO | U67733 |
| NID | g2108051 |
| VERSION | U67733.1 GI: 2108051 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 4240) |
| AUTORES | Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K. and Loughley, K. |
| TITULO | Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterase |
| REVISTA | Gene 191 (1), 89-95 (1997) |
| MEDLINE | 97354299 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 4240) |
| AUTORES | Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K. and Loughley, K. |
| TITULO | Envío directo |

207 ~~204~~

REVISTA Enviado el 21 de agosto de 1996. ICOS Corporation, 22021 20th Ave. S.E., Bothell, WA 98021, EE.UU.

```
CARACTERISTICAS          Localización/Cualificadores
source              1...4240
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
 gene                162..2987

                  /gene="PDE2A"
 CDS              162..2987
                  /gene="PDE2A"
                  /function="cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide
                  phosphodiesterase"
                  /note="PDE2 family; splice variant 3"
                  /codon_start=1
                  /product="PDE2A3"
                  /protein_id="AAC51320.1"
                  /db_xref="PID:g2108052"
                  /db_xref="GI:2108052"
                  /translation="MGQACGHSILCRSQQYPAARPAEPRGQQVFLKPDEPPPPPQPCA
                  DSLQDALLSLGSVIDISGLQRAVKEALSAVLPRVETVYTYLLDGESQLVCEDPPHELP
                  QEGKVREAIISQKRLGCNGLGFSDLPGKPLARLVAPLAPDTQVLVMPLADKEAGAVAA
                  VILVHCGQLSDNEEWSLQAVEKHTLVALRRVQVLQQRGPREAPRAVQNPPEGTAEDQK
                  GGAAYTDRDRKILQLCGELYDLDASSLQLKVLQYLQQETRASRCCLLLVSEDNLQLSC
                  KVIGDKVLGEEVSFPLTGCLGQVVEDKKSIQLKDLTSEDVQQLQSMLGCELQAMLCVP
                  VISRATDQVVALACAFNKLEGDLFTDEDEHVIQHCFHYTSTVLTSTLAFQKEQKLKCE
                  CQALLQVAKNLFTHLDDVSVLLQEIITEARNLSNAEICSVFLLDQNELVAKVFDGGVV
                  DDESYEIRIPADQGIAGHVATTGQILNIPDAYAHPLFYRGVDDSTGFRTRNILCFPIK
                  NENQEVIGVAELVNKINGPWFSKFDEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHL
                  ANEMMMYHMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQ
                  DMNFINNYKIDCPTLARFCLMVKKGYRDPPYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLE
                  DIEIFALFISCMCHDLDHRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSVMERHHFAQAIAILNT
                  HGCNIFDHFSRKDYQRMLDLMRDIILATDLAHHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHHRL
                  LLCLLMTSCDLSDQTKGWKTTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIP
                  ELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNREHWTKVSHKFTIRGLPSNNSLD
                  FLDEEYEVPDLDGTRAPINGCCSLDAE"
```

RECUENTO DE BASES 902 a, 1260 c, 1202 g, 876 t

ADRID

ORIGEN

```
   1 cagcagagct ggattggggt gttgagtcca ggctgagtag ggggcagccc actgctcttg
  61 gtccctgtgc ctgctggggg tgccctgccc tgaactccag gcagcgggga cagggcgagg
 121 tgccacctta gtctggctgg ggaggcggac gatgaggagt gatggggcag gcatgcggcc
 181 actccatcct ctgcaggagc cagcagtacc cggcagcgcg accggctgag ccgcggggcc
 241 agcaggtctt cctcaagccg gacgagccgc cgccgccgcc gcagccatgc gccgacagcc
 301 tgcaggacgc cttgctgagt ctgggctctg tcatcgacat ttcaggcctg caacgtgctg
 361 tcaaggaggc cctgtcagct gtgctccccc gagtggaaac tgtctacacc tacctactgg
 421 atggtgagtc ccagctggtg tgtgaggacc ccccacatga gctgccccag gaggggaaag
 481 tccgggaggc tatcatctcc cagaagcggc tgggctgcaa tgggctgggc ttctcagacc
 541 tgccagggaa gcccttggcc aggctggtgg ctccactggc tcctgatacc caagtgctgg
 601 tcatgccgct agcggacaag gaggctgggg ccgtggcagc tgtcatcttg gtgcactgtg
 661 gccagctgag tgataatgag gaatggagcc tgcaggcggt ggagaagcat accctggtcg
 721 ccctgcggag ggtgcaggtc ctgcagcagc gcgggcccag ggaggctccc cgagccgtcc
 781 agaacccccc ggaggggacg gcggaagacc agaagggcgg ggcggcgtac accgaccgcg
 841 accgcaagat cctccaactg tgcggggaac tctacgacct ggatgcctct tccctgcagc
 901 tcaaagtgct ccaatacctg cagcaggaga cccgggcatc ccgctgctgc ctcctgctgg
 961 tgtcggagga caatctccag ctttcttgca aggtcatcgg agacaaagtg ctcggggaag
1021 aggtcagctt tcccttgaca ggatgcctgg gccaggtggt ggaagacaag aagtccatcc
1081 agctgaagga cctcacctcc gaggatgtac aacagctgca gagcatgttg ggctgtgagc
1141 tgcaggccat gctctgtgtc cctgtcatca gccgggccac tgaccaggtg gtggccttgg
1201 cctgcgcctt caacaagcta gaaggagact tgttcaccga cgaggacgag catgtgatcc
1261 agcactgctt ccactacacc agcaccgtgc tcaccagcac cctggccttc cagaaggaac
1321 agaaactcaa gtgtgagtgc caggctcttc tccaagtggc aaagaacctc ttcacccacc
1381 tggatgacgt ctctgtcctg ctccaggaga tcatcacgga ggccagaaac ctcagcaacg
1441 cagagatctg ctctgtgttc ctgctggatc agaatgagct ggtggccaag gtgttcgacg
1501 ggggcgtggt ggatgatgag agctatgaga tccgcatccc ggccgatcag ggcatcgcgg
1561 gacacgtggc gaccacgggc cagatcctga acatccctga cgcatatgcc catccgcttt
1621 tctaccgcgg cgtggacgac agcaccggct tccgcacgcg caacatcctc tgcttcccca
```

```
1681 tcaagaacga gaaccaggag gtcatcggtg tggccgagct ggtgaacaag atcaatgggc
1741 catggttcag caagttcgac gaggacctgg cgacggcctt ctccatctac tgcggcatca
1801 gcatcgccca ttctctccta tacaaaaaag tgaatgaggc tcagtatcgc agccacctgg
1861 ccaatgagat gatgatgtac cacatgaagg tctccgacga tgagtatacc aaacttctcc
1921 atgatgggat ccagcctgtg gctgccattg actccaattt tgcaagtttc acctataccc
1981 ctcgttccct gcccgaggat gacacgtcca tggccatcct gagcatgctg caggacatga
2041 atttcatcaa caactacaaa attgactgcc cgaccctggc ccggttctgt ttgatggtga
2101 agaagggcta ccgggatccc ccctaccaca actggatgca cgccttttct gtctcccact
2161 tctgctacct gctctacaag aacctggagc tcaccaacta cctcgaggac atcgagatct
2221 ttgccttgtt tatttcctgc atgtgtcatg acctggacca cagaggcaca aacaactctt
2281 tccaggtggc ctcgaaatct gtgctggctg cgctctacag ctctgagggc tccgtcatgg
2341 agaggcacca ctttgctcag gccatcgcca tcctcaacac ccacggctgc aacatctttg
2401 atcatttctc ccggaaggac tatcagcgca tgctggatct gatgcgggac atcatcttgg
2461 ccacagacct ggcccaccat ctccgcatct tcaaggacct ccagaagatg gctgaggtgg
2521 gctacgaccg aaacaacaag cagcaccaca gacttctcct ctgcctcctc atgacctcct
2581 gtgacctctc tgaccagacc aagggctgga agactacgag aaagatcgcg gagctgatct
2641 acaaagaatt cttctcccag ggagacctgg agaaggccat gggcaacagg ccgatggaga
2701 tgatggaccg ggagaaggcc tatatccctg agctgcaaat cagcttcatg gagcacattg
2761 caatgcccat ctacaagctg ttgcaggacc tgttccccaa agcggcagag ctgtacgagc
2821 gcgtggcctc caaccgtgag cactggacca aggtgtccca caagttcacc atccgcggcc
2881 tcccaagtaa caactcgctg gacttcctgg atgaggagta cgaggtgcct gatctggatg
2941 gcactagggc cccatcaat ggctgctgca gccttgatgc tgagtgatcc cctccaggac
3001 acttccctgc ccaggccacc tcccacagcc ctccactggt ctggccagat gcactgggaa
3061 cagagccacg ggtcctgggt cctagaccag gacttcctgt gtgaccctgg acaagtacta
3121 cctttctggg cctcagcttt ctcgtctgta taatggaagc aagacttcca acctcacgga
3181 gactttgtaa tttgcttctc tgagagcaca ggggtgacca atgagcagtg ggccctactc
3241 tgcacctctg accacacctt ggcaagtctt tcccaagcca ttctttgtct gagcagcttg
3301 atggtttctc cttgccccat ttctgcccca ccagatcttt gctcctttcc ctttgaggac
3361 tcccaccctt tgggtctcca ggatcctcat ggaaggggaa ggtgagacat ctgagtgagc
3421 agagtgtggc atcttggaaa cagtccttag ttctgtggga ggactagaaa cagccgcggc
3481 gaaggccccc tgaggaccac tactatactg atggtgggat tgggacctgg gggatacagg
3541 ggccccagga agaagctggc cagaggggca gctcagtgct ctgcagagag ggccctggg
3601 gagaagcagg atgggattga tgggcaggag ggatccccgc actgggagac aggcccaggt
3661 atgaatgagc cagccatgct tcctcctgcc tgtgtgacgc tgggcgagtc tcttcccctg
3721 tctgggccaa acagggagcg ggtaagacaa tccatgctct aagatccatt ttagatcaat
3781 gtctaaaata gctctatggc tctgcggagt cccagcagag gctatggaat gtttctgcaa
3841 ccctaaggca cagagagcca accctgagtg tctcagaggc cccctgagtg ttccccttgg
3901 cctgagcccc ttacccattc ctgcagccag tgagagacct ggcctcagcc tggcagcgct
3961 ctcttcaagg ccatatccac ctgtgccctg ggcttggga gaccccatag gccgggactc
4021 ttgggtcagc ccgccactgg cttctctctt tttctccgtt tcattctgtg tgcgttgtgg
4081 ggtgggggag gggtccacc tgccttacct ttctgagttg cctttagaga gatgcgtttt
4141 tctaggactc tgtgcaactg tcgtatatgg tcccgtgggc tgaccgcttt gtacatgaga
4201 ataaatctat ttctttctac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

4. NPY

| | |
|---|---|
| LOCUS | HUMNPY 551 pb mRNA PRI 7-ene-1995 |
| DEFINICION | mRNA de neuropéptido Y humano (NPY), cd completo. |
| ACCESO | K01911 |
| NID | g189273 |
| VERSION | K01911.1 GI:189273 |
| PALABRAS CLAVE | neuropéptido Y |
| FUENTE | feocromocitoma humano, cDNA a mRNA, clon pNPY3-75 |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 551) |
| AUTORES | Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M. y Dixon, J.E. |
| TITULO | Cloning, characterization and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine |
| REVISTA | Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (14), 4577-4581 (1984) |
| MEDLINE | 84272678 |
| COMENTARIO | El neuropéptido Y (NPY) es uno de los péptidos más abundantes en el sistema |

nervioso mamífero, y su extensa distribución sugiere un papel neurotransmisor o modulador. También se encuentra en algunas células de cromafina de la médula suprarrenal.

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

source 1...551

```
                 /organism="Homo sapiens"
                 /db_xref="taxon:9606"
                 /tissue_type="pheochromocytoma"
                 /map="7pter-q22"
   mRNA          <1..551
                 /gene="NPY"
                 /note="G00-119-456"
   gene          1..551
                 /gene="NPY"
   sig_peptide   87..170
                 /gene="NPY"
                 /note="G00-119-456"
   CDS           87..380
                 /gene="NPY"
                 /codon_start=1
                 /db_xref="GDB:G00-119-456"
                 /product="neuropeptide Y"
                 /protein_id="AAA59944.1"
                 /db_xref="PID:g189274"
                 /db_xref="GI:189274"
                 /translation="MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAED
                 MARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRLEDPAMW"
   mat_péptide   171..278
                 /gene="NPY"
                 /note="G00-119-456"
                 /product="neuropeptide Y"
```

RECUENTO DE BASES 131 a, 171 c, 129 g, 120 t

212

```
ORIGEN          51 pb cadena arriba de un sitio RsaI

      1 accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc
     61 ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgactgggg ctgtccggac
    121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgaggcg taccccctcca
    181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
    241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
    301 cactgatttc agacctcttg atgagagaaa gcacagaaaa tgttcccaga actcggcttg
    361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
    421 gcccatattt catcgtgtaa aacgagaatc cacccatcct accaatgcat gcagccactg
    481 tgctgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
    541 atcatgcatt c
```

## 5. Receptor de NPY Y1

```
LOCUS           A26481     2624 pb    mRNA PAT   17-oct-1995
DEFINICION      cDNA del gen del receptor Y1 de NPY humano.
ACCESO          A26481
NID             g1247452
VERSION         A26481.1 GI:1247452
PALABRAS CLAVE  -
FUENTE          humana
ORGANISMO       Homo sapiens
                Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata,
                Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini,
                Hominidae, Homo.
REFERENCIA      1 (bases 1 a 2624)
AUTORES         -
TITULO          HUMAN NEUROPEPTIDE Y-Y1 RECEPTOR
REVISTA         Patente: WO 9309227-A 3 13 de mayo de 1993)
CARACTERISTICAS          Localización/Cualificadores
```

213 ~~212~~

```
source          1..2624
                /organism="Homo sapiens"
                /db_xref="taxon:9606"
  CDS           152..1306
                /codon_start=1
                /product="neuropeptide Y Y1 receptor"
                /protein_id="CAA01819.1"
                /db_xref="PID:e205126"
                /db_xref="PID:g1247453"
                /db_xref="GI:1247453"
                /db_xref="SWISS-PROT:P25929"
                /translation="MNSTLFSQVENHSVHSNFSEKNAQLLAFENDDCHLPLAMIFTLA
                LAYGAVIILGVSGNLALIIIILKQKEMRNVTNILIVNLSFSDLLVAIMCLPFTFVYTL
                MDHWVFGEAMCKLNPFVQCVSITVSIFSLVLIAVERHQLIINPRGWRPNNRHAYVGIA
                VIWVLAVASSLPFLIYQVMTDEPFQNVTLDAYKDKYVCFDQFPSDSHRLSYTTLLLVL
                QYFGPLCFIFICYFKIYIRLKRRNNMMDKMRDNKYRSSETKRINIMLLSIVVAFAVCW
                LPLTIFNTVFDWNHQIIATCNHNLLFLLCHLTAMISTCVNPIFYGFLNKNFQRDLQFF
                FNFCDFRSRDDDYETIAMSTMHTDVSKTSLKQASPVAFKKINNNDDNEKI"
```

RECUENTO DE BASES 791 a, 479 c, 473 g, 878 t, 3 otras

ORIGEN

```
   1 attgttcagt tcaagggaat gaagaattca gaataatttt ggtaaatgga ttccaatatc
  61 gggaataaga ataagctgaa cagttgacct gctttgaaga aacatactgt ccatttgtct
 121 aaaataatct ataacaacca aaccaatcaa aatgaattca acattatttt cccaggttga
 181 aaatcattca gtccactcta atttctcaga gaagaatgcc cagcttctgg cttttgaaaa
 241 tgatgattgt catctgccct tggccatgat atttacctta gctcttgctt atggagctgt
 301 gatcattctt ggtgtctctg gaaacctggc cttgatcata atcatcttga aacaaaagga
 361 gatgagaaat gttaccaaca tcctgattgt gaacctttcc ttctcagact tgcttgttgc
 421 catcatgtgt ctccccttta catttgtcta cacattaatg gaccactggg tctttggtga
 481 ggcgatgtgt aagttgaatc cttttgtgca atgtgtttca atcactgtgt ccattttctc
 541 tctggttctc attgctgtgg aacgacatca gctgataatc aaccctcgag ggtggagacc
 601 aaataataga catgcttatg taggtattgc tgtgatttgg gtccttgctg tggcttcttc
 661 tttgcctttc ctgatctacc aagtaatgac tgatgagccg ttccaaaatg taacacttga
 721 tgcgtacaaa gacaaatacg tgtgctttga tcaatttcca tcggactctc ataggttgtc
 781 ttataccact ctcctcttgg tgctgcagta ttttggtcca ctttgtttta tatttatttg
 841 ctacttcaag atatatatac gcctaaaaag gagaaacaac atgatggaca agatgagaga
 901 caataagtac aggtccagtg aaaccaaaag aatcaatatc atgctgctct ccattgtggt
 961 agcatttgca gtctgctggc tccctcttac catctttaac actgtgtttg attggaatca
1021 tcagatcatt gctacctgca accacaatct gttattcctg ctctgccacc tcacagcaat
1081 gatatccact tgtgtcaacc ccatatttta tgggttcctg aacaaaaact tccagagaga
1141 cttgcagttc ttcttcaact tttgtgattt ccggtctcgg gatgatgatt atgaaacaat
1201 agccatgtcc acgatgcaca cagatgtttc caaaacttct ttgaagcaag caagcccagt
1261 cgcatttaaa aaaatcaaca acaatgatga caatgaaaaa atctgaaact acttatagcc
1321 tatggtcccg gatgacatct gtttaaaaac aagcacaacc tgcaacatac tttgattacc
1381 tgttctccca aggaatgggg ttgaaatcat ttgaaaatga ctaagatttt cttgtcttgc

1441 ttttttactg cttttgttgt agtgtcataa ttacatttgg aacaaaaggt gtgggctttg
1501 gggtctttctg gaaatagttt tgaccagaca tctttgaagt gctttttgtg aatttatgca
1561 tataatataa agacttttat actgtactta ttggaatgaa atttctttaa agtattacga
1621 tnnnctgact tcagaagtac ctgccatcca atacggtcat tagattgggt catcttgatt
1681 agnttagatt agattagatt gtcaacagat tgggccatcc ttactttatg ataggcatca
1741 ttttagtgtg ttacaatagt aacagtatgc aaaagcagca ttcaggagcc gaaagatagt
1801 cttgaagtca ttcagaagtg gtttgaggtt tctgtttttt ggtggttttt gtttgttttt
1861 tttttttttc accttaaggg aggctttcat ttcctcccga ctgattgtca cttaaatcaa
1921 aatttaaaaa tgaataaaaa gacatacttc tcagctgcaa atattatgga gaattgggca
1981 cccacaggaa tgaagagaga aagcagctcc ccaacttcaa aaccattttg gtacctgaca
2041 acaagagcat tttagagtaa ttaatttaat aaagtaaatt agtattgctg caaatagcta
2101 aattatatct atttgaattg atggtcaaga gattttccat tttttttaca gactgttcag
2161 tgtttgtcaa gcttctggtc taatatgtac tcgaaagact ttccgcttac aatttgtaga
2221 aacacaaata tcgttttcca tacagcagtg cctatatagt gactgatttt aactttcaat
2281 gtccatcttt caaaggaagt aacaccaagg tacaatgtta aaggaatatt cactttacct
2341 agcagggaaa aatacacaaa aactgcagat acttcatata gcccatttta acttgtataa
2401 actgtgtgac ttgtggcgtc ttataaataa tgcactgtaa agattactga atagttgtgt
2461 catgttaatg tgcctaattt catgtatctt gtaatcatga ttgagcctca gaatcatttg
2521 gagaaactat attttaaaga acaagacata cttcaatgta ttatacagat aaagtattac
2581 atgtgtttga ttttaaaagg gcggacattt tattaaaatc aagg
```

AN
113
ADRID

**6. Receptor de NPY Y2**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSU36269 1200 pb mRNA PRI 14-nov-1995 |
| DEFINICION | mRNA del receptor Y2 de neuropéptido Y/péptido YY humano, cd completo. |
| ACCESO | U36269 |
| NID | g1063633 |
| VERSION | U36269.1 GI:1063633 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1200) |
| AUTORES | Gerald, C., Walker, M.W., Vayssem P.J., He, C., Brancheck, T.A. y Weinshank, R.L. |
| TITULO | Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 270 (45), 26758-26761 (1995) |
| MEDLINE | 96070760 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 1200) |
| AUTORES | Gerald, C.A. |

[illegible]
ING [illegible]
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telef. [illegible]

TITULO Envío directo

REVISTA Enviada el 13 de septiembre de 1995. Christophe A. Gerald, Synaptic Pharmaceutical Corporation, Molecular Biology, 215 College Road, Paramus, NJ 07652, EE.UU.

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

source 1..1200

/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/clone="hhY2"
/sex="male"
/tissue_type="brain hippocampus"
/dev_stage="adult"

5'UTR 1..20

PATRICIA ... MORENO
ING.
...RID

```
CDS             21..1166
                /note='NPY/PYY Y2 receptor'
                /codon_start=1
                /product='neuropeptide Y/peptido YY Y2 receptor'
                /protein_id='AAC50281.1'
                /db_xref='PID:g1063634'
                /db_xref='GI:1063634'
                /translation='MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGPQTTPRGELVPDPEPELIDST
                KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTL
                CLPFTLTYTLMGEWKMGPVLCHLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKI
                SKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEKSIYGTV
                YSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAANDHYHQRRQKTTKMLVCVVVV
                FAVSWLPLHAFQLAVDIDSQVLDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRK
                AFLSAFRCEQRLDAIHSEVSVTFKAKKNLEVRKNSGPNDSFTEATNV'
3'UTR           1164..1200
```

RECUENTO DE BASES 292 a, 295 c, 299 g, 314 t

ORIGEN

```
   1 caagtggacc tgtactgaaa atgggtccaa taggtgcaga ggctgatgag aaccagacag
  61 tggaagaaat gaaggtggaa caatacgggc cacaaacaac tcctagaggt gaactggtcc
 121 ctgaccctga gccagagctt atagatagta ccaagctgat tgaggtacaa gttgttctca
 181 tattggccta ctgctccatc atcttgcttg ggtaattgg caactccttg gtgatccatg
 241 tggtgatcaa attcaagagc atgcgcacag taaccaactt tttcattgcc aatctggctg
 301 tggcagatct tttggtgaac actctgtgtc taccgttcac tcttacctat accttaatgg
 361 gggagtggaa aatgggtcct gtcctgtgcc acctggtgcc ctatgcccag ggcctggcag
 421 tacaagtatc cacaatcacc ttgacagtaa ttgccctgga ccggcacagg tgcatcgtct
 481 accacctaga gagcaagatc tccaagcgaa tcagcttcct gattattggc ttggcctggg
 541 gcatcagtgc cctgctggca agtcccctgg ccatcttccg ggagtattcg ctgattgaga
 601 tcatcccgga ctttgagatt gtggcctgta ctgaaaagtg gcctggcgag gagaagagca
 661 tctatggcac tgtctatagt ctttcttcct tgttgatctt gtatgttttg cctctgggca
 721 ttatatcatt ttcctacact cgcatttgga gtaaattgaa gaaccatgtc agtcctggag
 781 ctgcaaatga ccactaccat cagcgaaggc aaaaaaccac caaaatgctg gtgtgtgtgg
 841 tggtggtgtt tgcggtcagc tggctgcctc tccatgcctt ccagcttgcc gttgacattg
 901 acagccaggt cctggacctg aaggagtaca aactcatctt cacagtgttc cacatcatcg
 961 ccatgtgctc cacttttgcc aatcccctte tctatggctg gatgaacagc aactacagaa
1021 aggctttcct ctcggccttc cgctgtgagc agcggttgga tgccattcac tctgaggtgt
1081 ccgtgacatt caaggctaaa aagaacctgg aggtcagaaa gaacagtggc cccaatgact
1141 ctttcacaga ggctaccaat gtctaaggaa gctgtggtgt gaaaatgtat ggatgaattc
```

5 7. Receptor de NPY Y5

[illegible] MORENO
[illegible] MADRID

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSU66275 1370 pb mRNA PRI 18-oct-1996 |
| DEFINICION | mRNA del receptor Y5 de neuropéptido humano (NPYR5), cd completo. |
| ACCESO | U66275 |
| NID | g1620655 |
| VERSION | U66275.1 GI:1620655 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1370) |
| AUTORES | Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., DeCarr, L.B:, Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang., P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velázquez, N. y McCaleb, M.L. |
| TITULO | Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behaviour |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 271 (42), 26315-26319 (1996) |
| MEDLINE | 96421636 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 1370) |
| AUTORES | Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., |

MORENO
MAN
113
MADRID

DeCarr, L.B:, Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang., P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velázquez, N. y McCaleb, M.L.

TITULO Envío directo

REVISTA Enviada el 6 de agosto de 1996. Metabolic Disorders. Bayer Corporation, 400 Morgan Lane, West Haven, CT 06516, EE.UU.

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

```
source          1..1370
                /organism="Homo sapiens"
                /db_xref="taxon:9606"
   gene         18..1355
                /gene="NPYR5"
   CDS          18..1355
                /gene="NPYR5"
                /function="G protein-coupled receptor"
                /codon_start=1
                /product="neuropeptide Y5 receptor"
                /protein_id="AAC50741.1"
                /db_xref="PID:g1620656"
                /db_xref="GI:1620656"
                /translation="MDLELDEYYNKTLATENNTAATRNSDFPVWDDYKSSVDDLQYFL
                IGLYTFVSLLGFMGNLLILMALMKKRNQKTTVNFLIGNLAFSDILVVLFCSPFTLTSV
                LLDQWMFGKVMCHIMPFLQCVSVLVSTLILISIAIVRYHMIKHPISNNLTANHGYFLI
                ATVWTLGFAICSPLPVFHSLVELQETFGSALLSSRYLCVESWPSDSYRIAFTISLLLV
                QYILPLVCLTVSHTSVCRSISCGLSNKENRLEENEMINLTLHPSKKSGPQVKLSGSHK
                WSYSFIKKHRRRYSKKTACVLPAPERPSQENHSRILPENFGSVRSQLSSSSKFIPGVP
                TCFEIKPEENSDVHELRVKRSVTRIKKRSRSVFYRLTILILVFAVSWMPLHLFHVVTD
                FNDNLISNRHFKLVYCICHLLGMMSCCLNPILYGFLNNGIKADLVSLIHCLHM"
```

RECUENTO DE BASES 392 a, 263 c, 257 g, 458 t

ORIGEN

[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

```
   1 ccaagcagga ctataatatg gatttagagc tcgacgagta ttataacaag acacttgcca
  61 cagagaataa tactgctgcc actcggaatt ctgatttccc agtctgggat gactataaaa
 121 gcagtgtaga tgacttacag tattttctga ttgggctcta tacatttgta agtcttcttg
 181 gctttatggg gaatctactt attttaatgg ctctcatgaa aaagcgtaat cagaagacta

 241 cggtaaactt cctcataggc aatctggcct tttctgatat cttggttgtg ctgttttgct
 301 cacctttcac actgacgtct gtcttgctgg atcagtggat gtttggcaaa gtcatgtgcc
 361 atattatgcc ttttcttcaa tgtgtgtcag ttttggtttc aactttaatt ttaatatcaa
 421 ttgccattgt caggtatcat atgataaaac atcccatatc taataattta acagcaaacc
 481 atggctactt tctgatagct actgtctgga cactaggttt tgccatctgt tctccccttc
 541 cagtgtttca cagtcttgtg gaacttcaag aaacatttgg ttcagcattg ctgagcagca
 601 ggtatttatg tgttgagtca tggccatctg attcatacag aattgccttt actatctctt
 661 tattgctagt tcagtatatt ctgcccttag tttgtcttac tgtaagtcat acaagtgtct
 721 gcagaagtat aagctgtgga ttgtccaaca aagaaaacag acttgaagaa aatgagatga
 781 tcaacttaac tcttcatcca tccaaaaaga gtgggcctca ggtgaaactc tctggcagcc
 841 ataaatggag ttattcattc atcaaaaaac acagaagaag atatagcaag aagacagcat
 901 gtgtgttacc tgctccagaa agaccttctc aagagaacca ctccagaata cttccagaaa
 961 actttggctc tgtaagaagt cagctctctt catccagtaa gttcatacca ggggtcccca
1021 cttgctttga gataaaacct gaagaaaatt cagatgttca tgaattgaga gtaaaacgtt
1081 ctgttacaag aataaaaaag agatctcgaa gtgttttcta cagactgacc atactgatat
1141 tagtatttgc tgttagttgg atgccactac accttttcca tgtggtaact gattttaatg
1201 acaatcttat ttcaaatagg catttcaagt tggtgtattg catttgtcat ttgttgggca
1261 tgatgtcctg ttgtcttaat ccaattctat atgggtttct taataatggg attaaagctg
1321 atttagtgtc ccttatacac tgtcttcata tgtaataatt ctcactgttt
```

8. VIP

| | |
|---|---|
| LOCUS | VIP 1511 pb mRNA PRI 19-mar-1999 |
| DEFINICION | mRNA del péptido intestinal vasoactivo (VIP) de Homo sapiens. |
| ACCESO | NM_003381 |
| NID | g4507896 |
| VERSION | NM_003381.1 GI:4507896 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |

[illegible] RID

| | |
|---|---|
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1511) |
| AUTORES | DeLamarter, J.F., Buell, G.N., Kawashima, E., Polak, J.M. y Bloom, S.R. |
| TITULO | Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in bacterial cells |
| REVISTA | Peptides 6 Supl. 1, 95-102 (1985) |
| MEDLINE | 86016352 |
| COMENTARIO | REFSEQ: Esta secuencia de referencia se derivó de M36634.<br>RefSeq PROVISIONAL: Es un registro de secuencia de referencia provisional que no ha sido sujeto todavía a revisión humana. El registro de secuencia de referencia refinado final puede ser algo diferente de este. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1511 |

[illegible] AM [illegible] 113 [illegible] ADRID

222

```
                    /organism="Homo sapiens"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /map="6q24-q27"
                    /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene           1..1511
                    /gene="VIP"
                    /db_xref="MIM:192320"
                    /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide    67..129
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS            67..579

                    /gene="VIP"
                    /codon_start=1
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
                    /protein_id="NP_003372.1"
                    /db_xref="PID:g4507897"
                    /db_xref="GI:4507897"
                    /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                    GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                    LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                    SPDFPEELEK"
     mat_peptide    307..387
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide    439..522
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal   1326..1331

RECUENTO DE BASES 541 a, 255 c, 276 g, 439 t

ORIGEN
```

MADRID

```
   1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
  61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
 121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
 181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
 241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
 301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
 361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
 421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
 481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
 541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
 601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
 661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
 721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
 781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
 841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
 901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
 961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
1081 ataaaaagac attcttccaa aaagatttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1501 aaaaaaaaaa a
```

9. Receptor de VPAC1

LOCUS VIP 1511 pb mRNA PRI 19-mar-1999

DEFINICION mRNA del péptido intestinal vasoactivo (VIP) de Homo sapiens.

ACCESO NM_003381

NID g4507896

VERSION NM_003381.1 GI:4507896

PALABRAS CLAVE -

| | |
|---|---|
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1511) |
| AUTORES | DeLamarter, J.F., Buell, G.N., Kawashima, E., Polak, J.M. y Bloom, S.R. |
| TITULO | Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in bacterial cells |
| REVISTA | Peptides 6 Supl. 1, 95-102 (1985) |
| MEDLINE | 86016352 |
| COMENTARIO | REFSEQ: Esta secuencia de referencia se derivó de M36634.<br>RefSeq PROVISIONAL: Es un registro de secuencia de referencia provisional que no ha sido sujeto todavía a revisión humana. El registro de secuencia de referencia refinado final puede ser algo diferente de este. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1511 |

PATENT ... MADRID

```
                    /organism="Homo sapiens"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /map="6q24-q27"
                    /tissue_type="pancreatic tumor"
gene                1..1511
                    /gene="VIP"
                    /db_xref="MIM:192320"
                    /db_xref="LocusID:7432"
sig_peptide         67..129
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
CDS                 67..579

                    /gene="VIP"
                    /codon_start=1
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
                    /protein_id="NP_003372.1"
                    /db_xref="PID:g4507897"
                    /db_xref="GI:4507897"
                    /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                    GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                    LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                    SPDFPEELEK"
mat_peptide         307..387
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
mat_peptide         439..522
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
polyA_signal        1326..1331
```

RECUENTO DE BASES 541 a, 255 c, 276 g, 439 t

ORIGEN

```
   1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
  61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
 121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
 181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
 241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
 301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
 361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
 421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
 481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaagag gagcagtgag
 541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
 601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
 661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaatat
 721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
 781 aatagtattt gagagttcta aatttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
 841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
 901 aattatatga gacgttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
 961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
1081 ataaaaagac attcttccaa aaagatttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
1321 tcaataataa atattttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
1381 ttctgtgaaa tacatttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1501 aaaaaaaaaa a
```

10. Receptor de VPAC2

| | |
|---|---|
| LOCUS | HUMHVRP 1640 pb mRNA PRI 16-feb-1995 |
| DEFINICION | mRNA del receptor de VIP con preferencia por helodermina humano (receptor VIP2/PACAP) |
| ACCESO | L36566 |
| NID | g550477 |
| VERSION | L36566.1 GI:550477 |

| | |
|---|---|
| PALABRAS CLAVE | Receptor de PACAP, receptor de VIP, receptor de VIP con preferencia por helodermina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1640) |
| AUTORES | Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., J., Goosens, J.F., De Neef, P., Waelbroeck, M., y Robberecht, P. |
| TITULO | Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts |
| REVISTA | Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (3), 1617-1624 (1994) |
| MEDLINE | 95110300 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1640 |

PATRICIA ... MORENO
...AN
...113
...MADRID
Tel...

```
                    /organism="Homo sapiens"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /cell_line="SUP T1 lymphoblast"
                    /clone_lib="lamda ZAP II"
sig_peptide         163..231
                    /note="putative; putative"
CDS                 163..1479
                    /note="human VIP2 receptor was previously called
                    'helodermin-preferring VIP receptor'; transmembrane
                    domains are located at positions: 637-696; 772-844;
                    880-948; 1003-1071; 1147-1209; 1243-1302.; Potential
                    glycosylation sites are located at :334-336; 424-426;
                    436-438."
                    /codon_start=1
                    /function="VIP and PACAP receptor"
                    /protein_id="AAC37569.1"
                    /db_xref="PID:g550478"
                    /db_xref="GI:550478"
                    /translation="MRTLLPPALLTCWLLAPVNSIHPECRFHLEIQEEETKCTELLRS
                    QTEKHKACSGVWDNITCWRPANVGETVTVPCPKVFSNFYSKAGNISKNCTSDGWSETF
                    PDFVDACGYSDPEDESKITFYILVKAIYTLGYSVSLMSLATGSIILCLFRKLHCTRNY
                    IHLNLFLSFILRAISVLVKDDVLYSSSGTLHCPDQPSSWVGCKLSLVFLQYCIMANFF


                    WLLVEGLYLHTLLVAMLPPRRCFLAYLLIGWGLPTVCIGAWTAARLYLEDTGCWDTND
                    HSVPWWVIRIPILISIIVNFVLFISIIRILLQKLTSPDVGGNDQSQYKRLAKSTLLLI
                    PLFGVHYMVFAVFPISISSKYQILFELCLGSFQGLVVAVLYCFLNSEVQCELKRKWRS
                    RCPTPSASRDYRVCGSSFSRNGSEGALQFHRASRAQSFLQTETSVI"
mat_peptide         232..1476
                    /function="VIP and PACAP receptor"
```

RECUENTO DE BASES 315 a, 512 c, 461 g, 352 t

MORENO
RID

ORIGEN

```
   1 cgggacgagg gggcggcccc cgcgctcggg gcgctcggct acagctgcgg ggcccgaggt
  61 ctccgcgcac tcgctcccgg cccatgctgg aggcggcgga acccggggga cctaggacgg
 121 aggcggcggg cgctgggcgg cccccggcac gctgagctcg ggatgcggac gctgctgcct
 181 cccgcgctgc tgacctgctg gctgctcgcc cccgtgaaca gcattcaccc agaatgccga
 241 tttcatctgg aaatacagga ggaagaaaca aaatgtacag agcttctgag gtctcaaaca
 301 gaaaaacaca aagcctgcag tggcgtctgg gacaacatca cgtgctggcg gcctgccaat
 361 gtgggagaga ccgtcacggt gccctgccca aaagtcttca gcaattttta cagcaaagca
 421 ggaaacataa gcaaaaactg tacgagtgac ggatggtcag agacgttccc agatttcgtc
 481 gatgcctgtg gctacagcga cccggaggat gagagcaaga tcacgtttta tattctggtg
 541 aaggccattt ataccctggg ctacagtgtc tctctgatgt ctcttgcaac aggaagcata
 601 attctgtgcc tcttcaggaa gctgcactgc accaggaatt acatccacct gaacctgttc
 661 ctgtccttca tcctgagagc catctcagtg ctggtcaagg acgacgttct ctactccagc
 721 tctggcacgt tgcactgccc tgaccagcca tcctcctggg tgggctgcaa gctgagcctg
 781 gtcttcctgc agtactgcat catggccaac ttcttctggc tgctggtgga ggggctctac
 841 ctccacaccc tcctggtggc catgctcccc cctagaaggt gcttcctggc ctacctcctg
 901 atcggatggg gcctccccac cgtctgcatc ggtgcatgga ctgcggccag gctctactta
 961 gaagacaccg gttgctggga tacaaacgac cacagtgtgc cctggtgggt catacgaata
1021 ccgattttaa tttccatcat cgtcaatttt gtcctttttca ttagtattat acgaattttg
1081 ctgcagaagt taacatcccc agatgtcggc ggcaacgacc agtctcagta caagaggctg
1141 gccaagtcca cgctcctgct tatcccgctg ttcggcgtcc actacatggt gtttgccgtg
1201 tttcccatca gcatctcctc caaataccag atactgtttg agctgtgcct cgggtcgttc
1261 cagggcctgg tggtggccgt cctctactgt ttcctgaaca gtgaggtgca gtgcgagctg
1321 aagcgaaaat ggcgaagccg gtgcccgacc ccgtccgcga gccgggatta cagggtctgc
1381 ggttcctcct tctcccacaa cggctcggag ggcgccctgc agttccaccg cgcgtcccga
1441 gcccagtcct tcctgcaaac ggagacctcg gtcatctagc cccacccctg cctgtcggac
1501 gcggcgggag gcccacggtt cggggcttct gcggggctga gacgccggct tcctccttcc
1561 agatgcccga gcaccgtgtc gggcaggtca gcgcggtcct gactccgtca agctggttgt
1621 ccactaaacc ccatacctgg
```

ABREVIATURAS

FSD = disfunción sexual femenina

FSAD = trastorno de la excitación sexual femenina

cAMP = 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico

cGMP = 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico

$P_{cAMP}$ = potenciador de cAMP

$P_{cGMP}$ = potenciador de cGMP

$A_{cAMP}$ = activador de cAMP

$A_{cGMP}$ = activador de cGMP

$AM_{cAMP}$ = modulador adverso de cAMP

$AM_{cGMP}$ = modulador adverso de cGMP

$I_{cAMP}$ = inhibidor de cAMP

$I_{cGMP}$ = inhibidor de cGMP

$I:I_{cAMP}$ = inhibidor de un inhibidor de cAMP

$I:I_{cGMP}$ = inhibidor de un inhibidor de cGMP

$I:AM_{cAMP}$ = inhibidor de un modulador adverso de cAMP

$I:AM_{cGMP}$ = inhibidor de un modulador adverso de cGMP

$U:A_{cAMP}$ = sobrerregulador de un activador de cAMP

$U:A_{cGMP}$ = sobrerregulador de un activador de cGMP

AC = adenilato ciclasa
A:AC = activador de AC

NEP = endopeptidasa neutra
I:NEP = inhibidor de NEP

VIP = péptido intestinal vasoactivo
VIPr = receptor de VIP (puede expresarse como VIPR)
VIP$_n$ = receptor de un subtipo de VIP (tal como VIPR1, VIPR2)
A:VIPr = activador de VIPr
A:VIP$_n$ = activador de VIP$_n$
I:VIPr = inhibidor de VIPr
I:VIP$_n$ = inhibidor de VIP$_n$
I:I:VIPr = inhibidor de un inhibidor de VIPr
I:I:VIP$_n$ = inhibidor de un inhibidor de VIP$_n$

PDE = fosfodiesterasa
PDEn = familia de las PDE (por ejemplo PDE1, PDE2, etc.)
PDE$_{cAMP}$ = PDE hidrolizante de cAMP
PDE$_{cGMP}$ = PDE hidrolizante de cGMP
I:PDE = inhibidor de una PDE
I:PDE$_{cAMP}$ = inhibidor de una PDE hidrolizante de cAMP
I:PDE$_{cAMP}$ = inhibidor de una familia de PDE capaz de

113
MADRID

hidrolizar cAMP

NPY = neuropéptido Y

NPYr = receptor de NPY (puede expresarse como NPYR)

NPY $Y_n$ = subtipo de receptor $Y_n$ de NPY (por ejemplo NPY $Y_1$) (por ejemplo NPYR1)

I:NPY = inhibidor de NPY

I:NPY $Y_n$ = inhibidor de NPY $Y_n$ (donde n denota el subtipo de receptor de NPY)

kDa = kilodalton

pb = par de bases

kb = kilopar de bases

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso consiguiente en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el agente es un mediador de la vasorrelajación vaginal.

3. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la composición es para administración oral.

4. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de los FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

5. El uso según la reivindicación 4, en el que el agente es un mediador de la vasorrelajación vaginal.

6. El uso según las reivindicaciones 4 ó 5, en la que el medicamento es para administración oral.

7. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

8. Un procedimiento según la reivindicación 7 en el que el agente es un mediador de la vasorrelajación vaginal.

9. Un procedimiento según las reivindicaciones 7 u 8, en el que el agente se administra oralmente.

10. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto un agente con cAMP y medir la actividad de cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de los FSAD.

11. Un procedimiento que comprende las etapas de:

(a) realizar el ensayo según la reivindicación 10.

(b) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente el cAMP, y

(c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados.

12. Un procedimiento de tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, por potenciación de cAMP in vivo con un agente,

siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente el cAMP en un procedimiento de ensayo in vitro,

siendo el procedimiento de ensayo in vitro el procedimiento de ensayo definido en la reivindicación 10.

13. El uso de un agente en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de los FSAD, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente el cAMP cuando se ensaya in vitro mediante

MADRID

un procedimiento de ensayo según la reivindicación 10.

14. Un agente identificado por el procedimiento de ensayo según la reivindicación 10.

15. Un agente según la reivindicación 14 para uso en medicina.

16. Un agente según la reivindicación 14 para uso en el tratamiento de los FSAD.

17. Un medicamento de administración oral para tratar FSAD, comprendiendo el medicamento el agente según la reivindicación 14.

18. Un procedimiento de diagnóstico, comprendiendo el procedimiento aislar una muestra de una hembra, determinar si la muestra contiene una entidad presente en una cantidad tal que produzca FSAD, o si está en una cantidad como para producir FSAD, teniendo la entidad un efecto directo o indirecto sobre el nivel o la actividad de cAMP en los genitales sexuales de la hembra.

19. Una composición o estuche de diagnóstico que comprende medios para detectar una entidad en una muestra aislada de

una hembra, pudiendo utilizarse los medios para determinar si la muestra contiene la entidad presente en una cantidad tal que produzca FSAD, o si está en una cantidad tal como producir FSAD, teniendo la entidad un efecto directo o indirecto sobre el nivel o la actividad del cAMP en los genitales sexuales de la hembra.

20. Un modelo animal utilizado para identificar agentes capaces de tratar FSD, (en particular) FSAD, comprendiendo el citado modelo un animal hembra anestesiado, incluyendo los medios para medir los cambios del flujo sanguíneo vaginal del citado animal a continuación de la estimulación del nervio pélvico de éste.

21. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente elcAMP para tratar FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: administrar un agente al modelo animal de la reivindicación 20, y medir cualquier potenciación de cAMP y/o aumento en el flujo sanguíneo vaginal del citado animal.

22. Un agente identificado por el procedimiento de ensayo de la reivindicación 21.

PATRICIA HACH MORENO
ING [illegible]
[illegible] 113
[illegible] MADRID

238

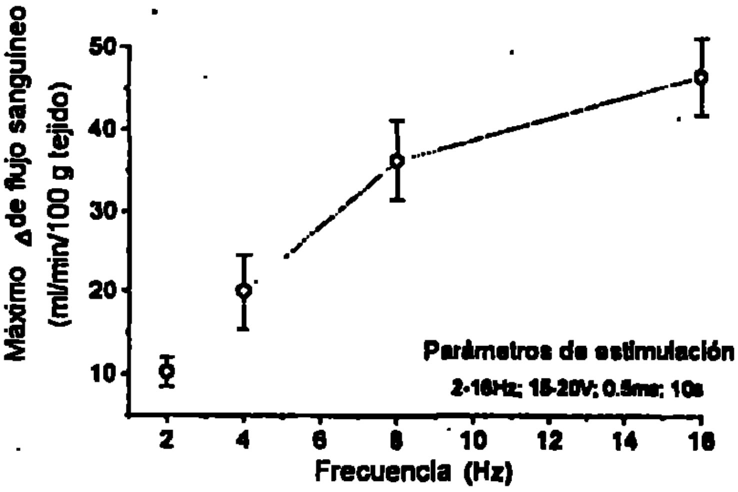
## RESUMEN

## PRODUCTO FARMACEUTICO

Se describe un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD. El procedimiento comprende suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad tal que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra. El agente puede mezclarse con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

**Figura 1**

**Flujo sanguíneo vaginal. Relación de respuesta a la frecuencia entre la estimulación del nervio pélvico y el flujo sanguíneo máximo**

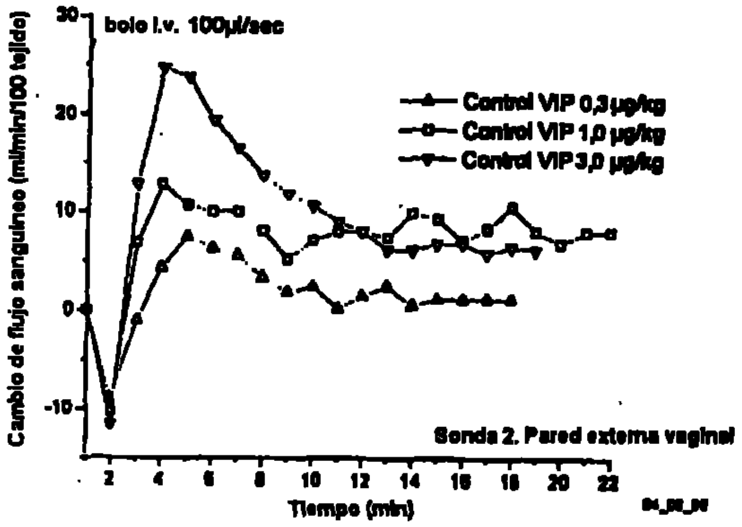


PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible]
MADRID
TEL. [illegible]

## Figura 2

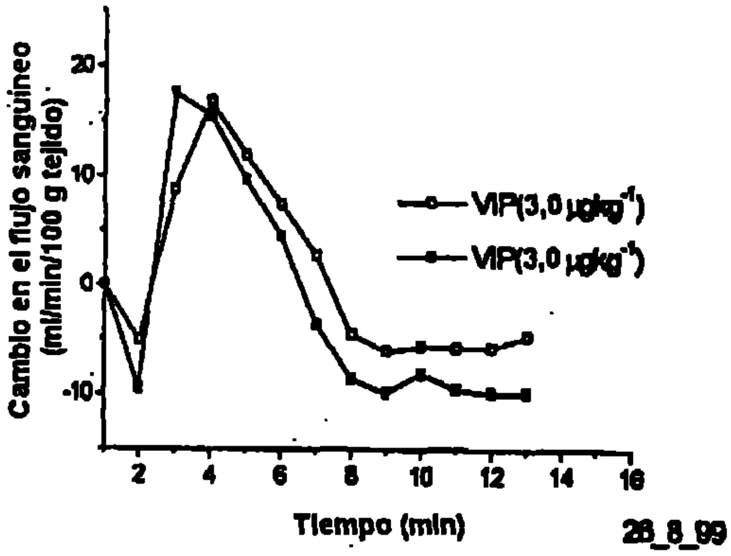
## Efecto de VIP en el flujo sanguíneo en la pared vaginal

a



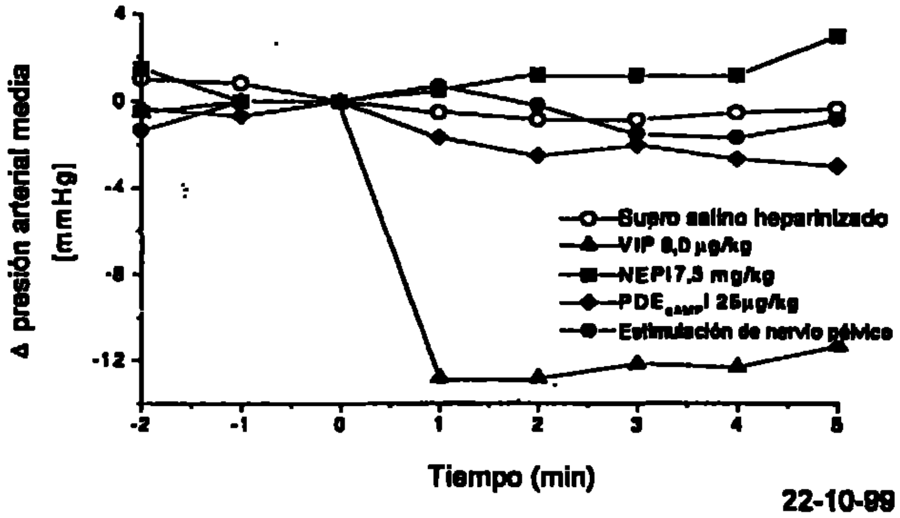
## Efectos de infusiones repetidas de VIP sobre el flujo sanguíneo vaginal

b



## Figura 3

**Efecto de VIP, un inhibidor de NEP, un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ o de la estimulación del nervio pélvico sobre la presión arterial media en conejo anestesiado**

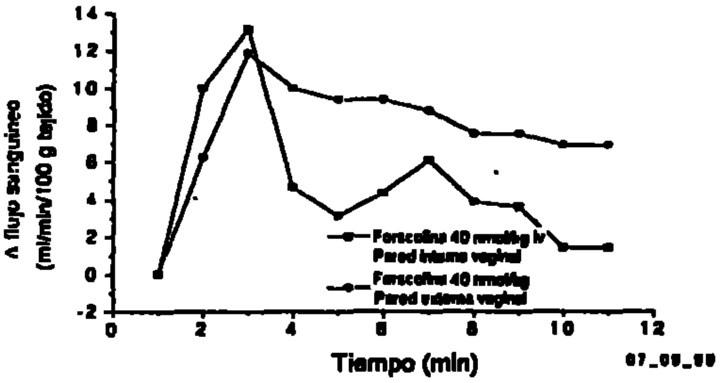


22-10-99

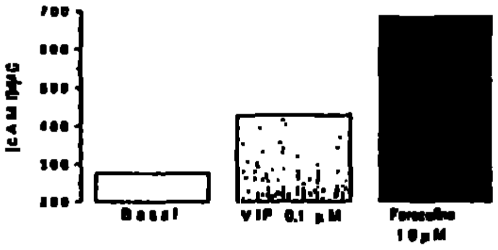
RID

Figura 4

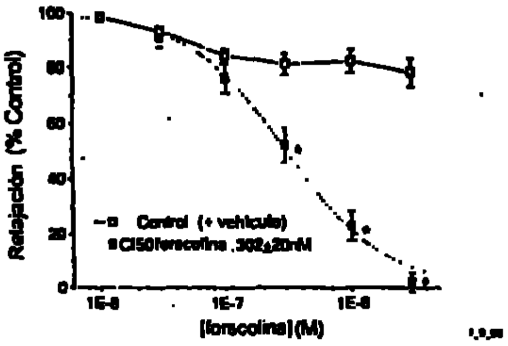
4a) La forscolina (un mimético de cAMP) aumenta el flujo sanguíneo vaginal en conejo anestesiado



4b) VIP estimula la producción de cAMP en vagina de conejo aislada



4c) Efecto relajante de la forscolina (un mimético de cAMP) sobre vagina de conejo aislada



[illegible] MORENO
[illegible] ADRID

Figura 5

## Efecto de la inhibición del NEP sobre los aumentos por estimulación del nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal de conejo anestesiado

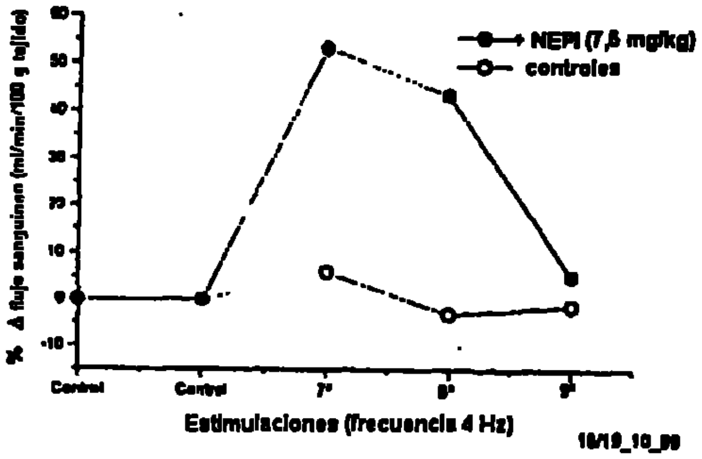
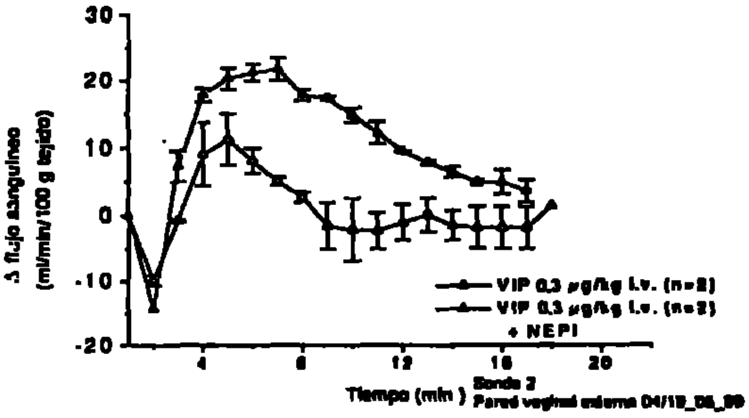


Figura 6

Efecto de VIP (0,3 µg/kg, iv) sobre el flujo sanguíneo vaginal en presencia y ausencia de un inhibidor de NEP



Efecto de VIP (3,0 µg/kg) sobre el flujo sanguíneo vaginal en presencia y ausencia de un inhibidor de NEP

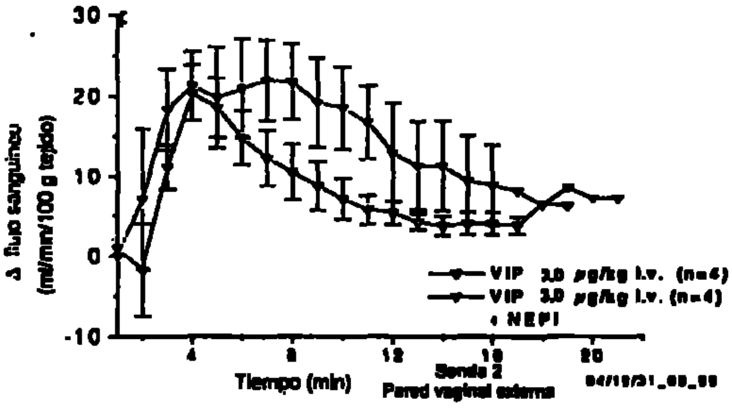
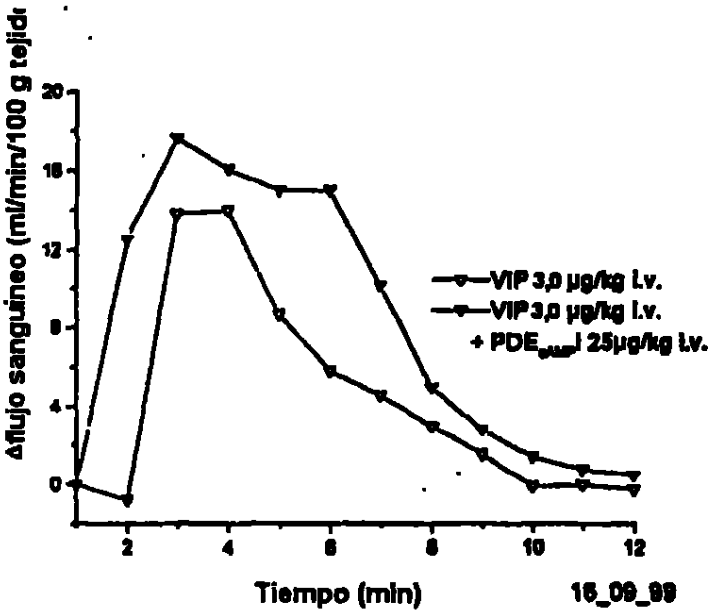


Figura 7

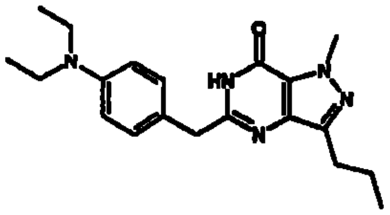
Efecto de un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ sobre los aumentos inducidos por el VIP en el flujo sanguíneo vaginal



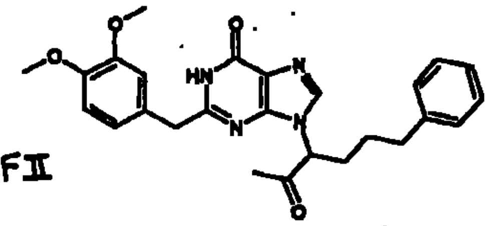
PATRICIA ISERN ...
INGLES Y ...
... MADRID

**Figura 8**

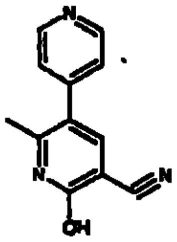
FI



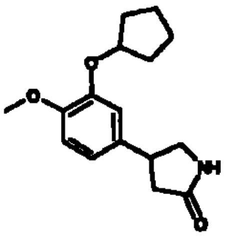
FII



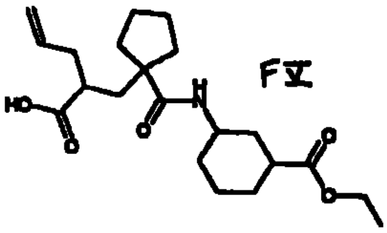
FIII



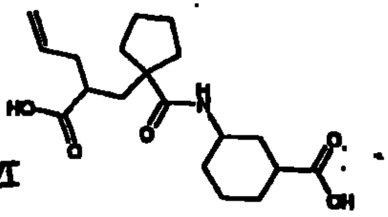
FIV



FV



FVI



PATRICIA KOCH MORENO
ING [illegible] ÁN
[illegible] 113
Teléf. [illegible] MADRID

Doña PATRICIA KOCH MORENO, intérprete jurado de inglés y alemán, certifica que la adjunta es traducción fiel y completa al español del documento adjunto redactado en inglés.

En Madrid, a 25 OCT 2000

PATRICIA KOCH MORENO
ING [illegible] ÁN
[illegible] nº, 113
Teléf. [illegible] MADRID

PCS10343PROV

248

INVESTOR IN PEOPLE

The Patent Office
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

I, the undersigned, being an officer duly authorised in accordance with Section 74(1) and (4) of the Deregulation & Contracting Out Act 1994, to sign and issue certificates on behalf of the Comptroller-General, hereby certify that annexed hereto is a true copy of the documents as originally filed in connection with the patent application identified therein.

In accordance with the Patents (Companies Re-registration) Rules 1982, if a company named in this certificate and any accompanying documents has re-registered under the Companies Act 1980 with the same name as that with which it was registered immediately before re-registration save for the substitution as, or inclusion as, the last part of the name of the words "public limited company" or their equivalents in Welsh, references to the name of the company in this certificate and any accompanying documents shall be treated as references to the name with which it is so re-registered.

In accordance with the rules, the words "public limited company" may be replaced by p.l.c., plc, P.L.C. or PLC.

Re-registration under the Companies Act does not constitute a new legal entity but merely subjects the company to certain additional company law rules.

Signed R. Mahoney

Dated 02 August 2000

**Patents Form 1/77**

Patents Act 1977
(Rule 16)

The Patent Office

249

THE PATENT OFFICE
NOV 1999

09NOV99 E490326-27 D02246
P01/7700 0.00-9926437.6

# Request for a grant of a patent

*(See the notes on the back of this form. You can also get an explanatory leaflet from the Patent Office to help you fill in this form)*

The Patent Office

Cardiff Road
Newport
Gwent NP9 1RH

---

1. **Your reference** P7553.GB

2. **Patent application number** *(The Patent Office will fill in this part)* 9926437.6

3. **Full name, address and postcode of the or of each applicant** *(underline all surnames)*

Pfizer Limited
Ramsgate Road
Sandwich
Kent
CT13 9NJ

**Patents ADP number** *(if you know it)* 1271001

**If the applicant is a corporate body, give the country/state of its incorporation** United Kingdom

4. **Title of the invention** PHARMACEUTICAL

5. **Name of your agent** *(if you have one)* D YOUNG & CO

**"Address for service" in the United Kingdom to which all correspondence should be sent** *(including the postcode)*

21 NEW FETTER LANE
LONDON
EC4A 1DA

**Patents ADP number** *(if you have one)* 59006

6. **If you are declaring priority from one or more earlier patent applications, give the country and date of filing of the or each of these earlier applications and (if you know it) the or each application number**

| Country | Priority application number *(if you know it)* | Date of filing *(day/month/year)* |
|---|---|---|
| | | |

7. **If this application is divided or otherwise derived from an earlier UK application, give the number and filing date of the earlier application**

| Number of earlier application | Date of filing *(day/month/year)* |
|---|---|
| | |

|  |  |  |
|---|---|---|
| 8. | Is a statement of inventorship and of right to grant of a patent required in support of this request? *(Answer 'Yes' if:*<br>*a) any applicant named in part 3 is not an inventor, or*<br>*b) there is an inventor who is not named as an applicant, or*<br>*c) any named applicant is a corporate body.*<br>*See note (d))* | YES |

---

| | | |
|---|---|---|
| 9. | Enter the number of sheets for any of the following items you are filing with this form. Do not count copies of the same document | |
| | Continuation sheets of this form | |
| | Description | 120 |
| | Claims(s) | 3 |
| | Abstract | 1 |
| | Drawing(s) | 8 |

---

| | | |
|---|---|---|
| 10. | If you are also filing any of the following, state how many against each item. | |
| | Priority documents | |
| | Translations of priority documents | |
| | Statement of inventorship and right to grant of a patent *(Patents Form 7/77)* | |
| | Request for preliminary examination and search *(Patents Form 9/77)* | |
| | Request for substantive examination *(Patents Form 10/77)* | |
| | Any other documents *(please specify)* | |

---

11.

I/We request the grant of a patent on the basis of this application.

Signature

for D Young & Co

D YOUNG & CO
Agents for the Applicants

Date

5 November 1999

---

12. Name and daytime telephone number of the person to contact in the United Kingdom

---

**Warning**

*After an application for a patent has been filed, the Comptroller of the Patent Office will consider whether publication or communication of the invention should be prohibited or restricted under Section 22 of the Patents Act 1977. You will be informed if it is necessary to prohibit or restrict your invention in this way. Furthermore, if you live in the United Kingdom, Section 23 of the Patents Act 1977 stops you from applying for a patent abroad without first getting written permission from the Patent Office unless an application has been filed at least 6 weeks beforehand in the United Kingdom for a patent for the same invention and either no direction prohibiting publication or communication has been given, or any such direction has been revoked.*

**Notes**

*a) If you need help to fill in this form or you have any questions, please contact the Patent Office on 01645 500505*

*b) Write your answers in capital letters using black ink or you may type them*

*c) If there is not enough space for all the relevant details on any part of this form, please continue on a separate sheet of paper and write "see continuation sheet" in the relevant part(s). Any continuation sheet should be attached to this form.*

*d) If you answered 'Yes' Patents Form 7/77 will need to be filed.*

*e) Once you have filled in the form you must remember to sign and date it.*

*f) For details of the fee and ways to pay please contact the Patent Office.*

# PHARMACEUTICAL

## FIELD OF INVENTION

The present invention relates to a pharmaceutical that is useful for the treatment of female sexual dysfunction (FSD), in particular female sexual arousal dysfunction (FSAD).

The present invention also relates to a method of treatment of FSD, in particular FSAD.

The present invention also relates to assays to screen for compounds useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

For convenience, a list of abbreviations that are used in the following text is presented before the Claims section.

## FEMALE SEXUAL RESPONSE

The female sexual response phase of arousal is not easily distinguished from the phase of desire until physiological changes begin to take place in the vagina and clitoris as well as other sexual organs. Sexual excitement and pleasure are accompanied by a combination of vascular and neuromuscular events which lead to engorgement of the clitoris, labia and vaginal wall, increased vaginal lubrication and dilatation of the vaginal lumen (Levin, 1980; Ottesen, 1983; Levin, 1991; Levin, 1992; Sjoberg, 1992; Wagner, 1992; Schiavi *et al.*, 1995; Masters *et al.*, 1996; Berman *et al.*, 1999).

Vaginal engorgement enables transudation to occur and this process is responsible for increased vaginal lubrication. Transudation allows a flow of plasma through the epithelium and onto the vaginal surface, the driving force for which is increased blood flow in the vaginal capillary bed during the aroused state. In addition engorgement leads to an increase in vaginal length and luminal diameter, especially in the distal 2/3 of the vaginal canal. The luminal dilatation of the vagina is due to a combination of smooth muscle relaxation of its wall and skeletal muscle relaxation of the pelvic floor muscles. Some sexual pain disorders such as vaginismus are thought to be due, at least in part, by inadequate relaxation preventing dilatation of the vagina; it

has yet to be ascertained if this is primarily a smooth or skeletal muscle problem. (Levin, 1980; Ottesen, 1983; Levin, 1991; Levin, 1992; Sjoberg, 1992; Wagner, 1992; Schiavi *et al.*, 1995; Master *et al.*, 1996; Berman *et al.*, 1999).

The vasculature and micro vasculature of the vagina are innervated by nerves containing neuropeptides and other neurotransmitter candidates. These include calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NPY), nitric oxide synthase (NOS), substance P and vasoactive intestinal peptide (VIP) (Hoyle *et al.*, 1996). Nitric oxide synthase, which is often colocalised with VIP, displays a greater expression, immunologically, in the deep arteries and veins rather than in the blood vessels of the propria (Hoyle *et al.*, 1996).

## FEMALE SEXUAL DYSFUNCTION

It is known that some individuals can suffer from female sexual dysfunction (FSD).

FSD is best defined as the difficulty or inability of a woman to find satisfaction in sexual expression. FSD is a collective term for several diverse female sexual disorders (Leiblum, 1998, Berman *et al.*, 1999). The woman may have lack of desire, difficulty with arousal or orgasm, pain with intercourse or a combination of these problems. Several types of disease, medications, injuries or psychological problems can cause FSD. Treatments in development are targeted to treat specific subtypes of FSD, predominantly desire and arousal disorders.

The categories of FSD are best defined by contrasting them to the phases of normal female sexual response: desire, arousal and orgasm (Kaplan et al., 1979). Desire or libido is the drive for sexual expression. Its manifestations often include sexual thoughts either when in the company of an interested partner or when exposed to other erotic stimuli. Arousal is the vascular response to sexual stimulation, an important component of which is vaginal lubrication and elongation of the vagina. Orgasm is the release of sexual tension that has culminated during arousal.

Hence, FSD occurs when a woman has an inadequate or unsatisfactory response in any of these phases, usually desire, arousal or orgasm. FSD categories include hypoactive sexual desire disorder, sexual arousal disorder, orgasmic disorders and sexual pain disorders.

Hypoactive sexual desire disorder is present if a woman has no or little desire to be sexual, and has no or few sexual thoughts or fantasies. This type of FSD can be caused by low testosterone levels, due either to natural menopause or to surgical menopause. Other causes include illness, medications, fatigue, depression and anxiety.

Sexual arousal disorder (FSAD) is characterised by inadequate genital response to sexual stimulation. The genitalia do not undergo the engorgement that characterises normal sexual arousal. The vaginal walls are poorly lubricated, so that intercourse is painful. Orgasms may be impeded. Arousal disorder can be caused by reduced oestrogen at menopause or after childbirth and during lactation, as well as by illnesses, with vascular components such as diabetes and atherosclerosis. Other causes result from treatment with diuretics, antihistamines, antidepressants eg SSRIs or antihypertensive agents.

Sexual pain disorders (includes dyspareunia and vaginismus) is characterised by pain resulting from penetration and may be caused by medications which reduce lubrication, endometriosis, pelvic inflammatory disease, inflammatory bowel disease or urinary tract problems.

The prevalence of FSD is difficult to gauge because the term covers several types of problem, some of which are difficult to measure, and because the interest in treating FSD is relatively recent. Many women's sexual problems are associated either directly with the female ageing process or with chronic illnesses such as diabetes and hypertension.

There are wide variations in the reported incidence and prevalence of FSD, in part explained by the use of differing evaluation criteria, but most investigators report that a significant proportion of otherwise healthy women have symptoms of one or more of the FSD subgroups.

By way of example, studies comparing sexual dysfunction in couples reveal that 63% of women had arousal or orgasmic dysfunction compared with 40% of men have erectile or ejaculatory dysfunction (Frank *et al.*, 1978).

However, the prevalence of female sexual arousal disorder varies considerably from survey to survey. In a recent National Health and Social Life Survey 19% of women reported lubrication difficulties whereas 14% of women in an outpatient gynaecological clinic reported similar difficulties with lubrication (Rosen *et al.*, 1993).

Several studies have also reported dysfunction with sexual arousal in diabetic women (up to 47%), this included reduced vaginal lubrication (Wincze *et al.*, 1993). There was no association between neuropathy and sexual dysfunction.

Numerous studies have also shown that between 11-48% of women overall may have reduced sexual desire with age. Similarly, between 11-50% of women report problems with arousal and lubrication, and therefore experience pain with intercourse. Vaginismus is far less common, affecting approximately 1% of women.

Studies of sexually experienced women have detailed that 5-10% have primary anorgasmia. Another 10% have infrequent orgasms and a further 10% experience them inconsistently (Spector *et al.*, 1990).

Because FSD consists of several subtypes that express symptoms in separate phases of the sexual response cycle, there is not a single therapy. Current treatment of FSD focuses principally on psychological or relationship issues. Treatment of FSD is gradually evolving as more clinical and basic science studies are dedicated to the investigation of this medical problem. Female sexual complaints are not all psychological in pathophysiology, especially for those individuals who may have a component of vasculogenic dysfunction (eg FSAD) contributing to the overall female sexual complaint. There are at present no drugs licensed for the treatment of FSD. Empirical drug therapy includes oestrogen administration (topically or as hormone replacement therapy), androgens or mood-altering drugs such as buspirone or trazodone. These treatment options are often unsatisfactory due to low efficacy or unacceptable side effects.

Since interest is relatively recent in treating FSD pharmacologically, therapy consists of the following:- psychological counselling, over-the-counter sexual lubricants, and investigational candidates, including drugs approved for other conditions. These medications consist of hormonal agents, either testosterone or combinations of oestrogen and testosterone and more recently vascular drugs, that have proved

252

effective in male erectile dysfunction. None of these agents has been demonstrated to be very effective in treating FSD.

## FEMALE SEXUAL AROUSAL DISORDER (FSAD)

The Diagnostic and Statistical Manual (DSM) IV of the American Psychiatric Association defines Female Sexual Arousal Disorder (FSAD) as being:

> *"a persistent or recurrent inability to attain or to maintain until completion of the sexual activity adequate lubrication-swelling response of sexual excitement. The disturbance must cause marked distress or interpersonal difficulty."*

The arousal response consists of vasocongestion in the pelvis, vaginal lubrication and expansion and swelling of the external genitalia. The disturbance causes marked distress and/or interpersonal difficulty. Studies investigating sexual dysfunction in couples reveals that up to 63% of women have arousal or orgasmic dysfunction.

FSAD is a highly prevalent sexual disorder affecting pre-, peri- and post menopausal (±HRT) women. It is associated with concomitant disorders such as depression, cardiovascular diseases, diabetes and UG disorders.

The primary consequences of FSAD are lack of engorgement/swelling, lack of lubrication and lack of pleasurable genital sensation. The secondary consequences of FSAD are reduced sexual desire, pain during intercourse and difficulty in achieving an orgasm.

It has recently been hypothesised that there is a vascular basis for at least a proportion of patients with symptoms of FSAD (Goldstein *et al.*, 1998) with animal data supporting this view (Park *et al.*, 1997).

Drug candidates for treating FSAD, which are under investigation for efficacy, are primarily erectile dysfunction therapies that promote circulation to the male genitalia. They consist of two types of formulation, oral or sublingual medications (Apomorphine, Phentolamine, Sildenafil), and prostaglandin ($PGE_1$) that are injected or administered transurethrally in men, and topically to the genitalia in women. However, none of these therapies is that effective.

The present invention seeks to provide an effective means of treating FSAD.

## SUMMARY ASPECTS OF THE PRESENT INVENTION

The present invention is based on findings that FSAD is associated with reduced genital blood flow. Treatment of women with FSAD can be achieved by enhancement of genital blood flow with vasoactive agents. We have clearly shown that cAMP-mediates vaginal vasorelaxation and that vaginal blood flow can be enhanced/potentiated by elevation of cAMP levels. This is a seminal finding.

In this respect, no one has previously proposed that FSAD can be treated in such a way ie direct or indirect elevation of cAMP levels. Moreover, there are no teachings in the art to suggest that FSAD was associated with a detrimental modulation of cAMP activity and/or levels or that cAMP is responsible for mediating vaginal vasorelaxation. Hence, the present invention is surprising.

Thus, in a broad aspect, the present invention relates to the use of a cAMP potentiator to treat FSD, in particular FSAD.

The present invention is advantageous as it provides a means for restoring a normal sexual arousal response - namely increased genital blood flow leading to vaginal and labial engorgement. This will result in increased vaginal lubrication *via* plasma transudation, increased vaginal compliance and increased vaginal sensitivity. Hence, the present invention provides a means to restore, or mimic, the normal sexual arousal response.

## DETAILED ASPECTS OF THE PRESENT INVENTION

In one aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition for subsequent use in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

In another aspect, the present invention relates to the use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD.

In a further aspect, the present invention relates to a method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

In a further aspect, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In a further aspect, the present invention relates to a process comprising the steps of: (a) performing the assay according to the present invention; (b) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP activity; and (c) preparing a quantity of those one or more identified agents.

In a further aspect, the present invention relates to a method of treating FSD, in particular FSAD, by potentiating *in vivo* cAMP with an agent; wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP in an *in vitro* assay method; wherein the *in vitro* assay method is the assay method according to the present invention.

In a further aspect, the present invention relates to the use of an agent in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of FSD, in particular FSAD, wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP when assayed *in vitro* by the assay method according to the present invention.

In a further aspect, the present invention relates to an animal model used to identify agents capable of treating FSD (in particular FSAD), said model comprising an anaesthetised female animal including means to measure changes in vaginal blood flow of said animal following stimulation of the pelvic nerve thereof.

In a further aspect, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSAD, the assay method comprising: administering an agent to the animal model of the present invention; and measuring any potentiation of cAMP and/or increase in blood flow in the vagina of said animal.

For ease of reference, these and further aspects of the present invention are now discussed under appropriate section headings. However, the teachings under each section are not necessarily limited to each particular section.

## PREFERABLE ASPECTS

Preferably, the agent is for the treatment of FSAD.

Preferably, the agent is a mediator of vaginal vasorelaxation.

In one embodiment, preferably the agent is for oral administration.

In another embodiment, the agent may be for topical administration.

For some applications, preferably the agent has an indirect potentiating effect on cAMP. Alternatively expressed, for some applications, preferably the agent does not have a direct potentiating effect on cAMP. An example of an agent that has a direct potentiating effect is exogenously applied VIP. Nevertheless, it is to be understood that in this preferred aspect the agent may have an indirect potentiating effect on cAMP by acting on naturally found and laturally located directly acting agents – such as naturally found and located VIP.

For some applications, preferably the agent is an inhibitor – i.e. it is capable of exhibiting an inhibitory function.

For some applications, preferably the agent is a I:PDEII.

For some applications, preferably the agent is a I:NEP.

For some applications, preferably the agent is a selective I:PDEII.

254 犬

For some applications, preferably the agent is a selective I:NEP.

For some applications, preferably the agent does not cause - or is administered in such a fashion so that it does not cause – a prolonged drop in blood pressure (e.g. over a period of about 5 minutes or more). In this embodiment, if the agent is to be delivered topically then that agent may have the ability to cause a drop in blood pressure (such as if it were to be delivered intraveneously), provided that in the topical application minimal levels of the agent pass into the blood stream. For an oral agent, it is preferred that the agent does not cause a prolonged drop in blood pressure.

In a preferred aspect, the agent does not cause - or is administered in such a fashion so that it does not cause – a large increase in heart rate.

## POTENTIATING cAMP

As used herein with reference to cAMP, the term "potentiating" includes any one or more of: increasing the effectiveness of cAMP, increasing the levels of cAMP, increasing the activity of cAMP, decreasing the level of cAMP degradation, decreasing the level of cAMP inhibition.

The potentiating effect can be a direct effect. An example of a direct effect would be upregulation of cAMP levels by an agent that increases the expression thereof.

Alternatively, the potentiating effect could be an indirect effect. An example of such an effect would be action on a substance that would otherwise inhibit and/or reduce the levels and/or activity of cAMP. Another example of such an effect would increasing the action of a substance that increases the effectiveness of cAMP, increases the levels of cAMP, increases the activity of cAMP, decreases the level of cAMP degradation, or decreases the level of cAMP inhibition.

In the alternative, the agent may even act as a cAMP mimetic.

## cAMP Mimetic

As used herein, the term "cAMP mimetic" means an agent that can act in a similar fashion to cAMP in the female sexual genitalia and, in doing so, does any one or more of: increases the effectiveness of cAMP like moieties, increases the levels of cAMP like moieties, increases the activity of cAMP like moieties, decreases the level of degradation of cAMP like moieties, decreases the level of inhibition of cAMP like moieties.

Thus, in one aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition for subsequent use in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

Thus, in another aspect, the present invention relates to the use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

Thus, in a further aspect, the present invention relates to a method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to mimic potentiation of cAMP levels in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

An example of a cAMP mimetic would be forskolin. Here we have found that forskolin increases vaginal blood flow and it can also act as a vaginal relaxant.

In a preferred aspect, the cAMP mimetic is administered orally.

## ACTIVATOR OF cAMP

As used herein, the term "activator of cAMP" means a substance that controls or releases cAMP in the female sexual genitalia. The control may be direct or indirect. For ease of reference, we refer to these substances as $A_{cAMP}$.

## TARGET

The term "target" as used herein with reference to the present invention means any substance that is cAMP, an $A_{cAMP}$, an $I_{cAMP}$, or an $AM_{cAMP}$. Otherwise expressed, the target can also be referred to as a $P_{cAMP}$ target.

The target for the agent of the present invention may be an amino acid sequence and/or a nucleotide sequence encoding same and/or an expression unit responsible for the expression of same and/or a modulator of same.

The target may even be a combination of such targets.

## AGENT

The agent may be any suitable agent that can act as a $P_{cAMP}$.

The agent can be an amino acid sequence or a chemical derivative thereof. The substance may even be an organic compound or other chemical. The agent may even be a nucleotide sequence - which may be a sense sequence or an anti-sense sequence. The agent may be an antibody.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:NEP – that organic compound may typically comprise an amide group (i.e. –N(H)-C(O)- or even –C(O)-N(H)-) and one or more hydrocarbyl groups. Here, the term "hydrocarbyl group" means a group comprising at least C and H and may optionally comprise one or more other suitable substituents. Examples of such substituents may include halo-, alkoxy-, nitro-, an alkyl group, a cyclic group etc. In addition to the possibility of the substituents being a cyclic group, a combination of substituents may form a cyclic group. If the hydrocarbyl group comprises more than one C then those carbons need not necessarily be linked to each other. For example, at least two of the carbons may be linked *via* a suitable element or group. Thus, the hydrocarbyl group may contain hetero atoms. Suitable hetero atoms will be apparent to those skilled in the art and include, for instance, sulphur, nitrogen and oxygen. For some applications, preferably the agent comprises at least one cyclic group. For some applications, preferably the agent comprises at least one cyclic group linked to another hydrocarbyl group via an amide bond. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:PDE – that organic compound may typically comprise two or more linked hydrocarbyl groups. For some applications, preferably the agent comprises at least two cyclic groups – wherein one of which cyclic groups may be a fused cyclic ring structure. For some applications, preferably at least one of the cyclic groups is a heterocyclic group. For some applications, preferably the heterocyclic group comprises at least one N in the ring. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

The $P_{cAMP}$ may do any one or more of: directly or indirectly increase the effectiveness of cAMP, directly or indirectly increase the levels of cAMP, directly or indirectly increase the activity of cAMP, directly or indirectly decrease the level of cAMP degradation, directly or indirectly decrease the level of cAMP inhibition.

Preferably, the agent directly or indirectly increases cAMP levels in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

More preferably, the agent directly or indirectly selectively increases cAMP levels in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

In one aspect, the agent may inhibit or antagonise a suitable target and in doing so potentiate cAMP levels in the female sexual genitalia. In the text, we have used the term inhibitor to mean an inhibitor and/or antagonist.

In another aspect, the agent may activate or agonise a suitable target and in doing so potentiate cAMP levels in the female sexual genitalia. In the text, we have used the terms activator and upregulator inhibitor to mean activator and/or upregulator and/or agonist.

Thus, the agent may agonise, antagonise, upregulate, or inhibit a suitable target.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

Preferably, the agent may selectively agonise, selectively antagonise, selectively upregulate, or selectively inhibit a suitable target.

Preferably, the agent may selectively agonise, selectively antagonise, selectively upregulate, or selectively inhibit a selective, suitable target.

The agent of the present invention may also be capable of displaying one or more other beneficial functional properties. By way of example, the agent of the present invention may potentiate cAMP as well as potentiating cGMP. For some applications (such as a topical application), the agent may also display an ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitory action. For some applications (such as with particular patient types), such agents (i.e. those that also display ACE inhibitory action) may not be suitable for oral administration. For some applications, the agent may also display an ECE (endothelium converting enzyme) inhibitory action.

In a highly preferred embodiment, the agent is not exogenously administered VIP.

This is because there has been a report that VIP infusions lead to significant cardiovascular adverse effects such as increases in heart rate and a decrease in diastolic arterial blood pressure (Ottesen 1983, 1987, 1995)

In addition, even though, Ottesen and co-workers have demonstrated that VIP induces increases in vaginal blood flow and lubrication in healthy volunteers, the mechanism by which VIP is exerting it's effects are unclear. In the literature, there are a number of examples of VIP signalling through different second messenger systems eg cGMP/guanylate cyclase (Ashur-Fabian, 1999); carbon monoxide (CO)/heme oxygenase (Fan et al.,1998) and cAMP/adenylate cyclase (Foda,1995; Schoeffter, 1985; Gu, 1992). This is exemplified by a recent report which describes how the vasorelaxant effects of VIP in the uterine artery can be explained by the release of nitric oxide. (Jovanovic, 1998). Again, there is also evidence for VIP modulating nitric oxide (NO)/cGMP in male urogenital function (Kim, 1994).

Hence, it is desirable that the agent is not exogeneously applied VIP on its own. However, the present invention may encompass combinations of agents, wherein one of those agents is VIP. However, again, it is preferred that none of the agents is exogeneously applied VIP for the aforesaid reasons.

The agent may be used in combination with one or more other pharmaceutically active agents, such as a $P_{cGMP}$ (such as Sildenafil) and/or a centrally acting pharmaceutical (e.g. a dopamine agonist, such as apomorphine).

For some applications, preferably the agent has a $K_i$ value of less than about 100 nm, preferably less than about 75 nm, preferably less than about 50 nm, preferably less than about 25 nm, preferably less than about 20 nm, preferably less than about 15 nm, preferably 10 nm, preferably 5 nm.

For some applications, preferably the agent has a $K_b$ value of less than about 100 nm, preferably less than about 75 nm, preferably less than about 50 nm, preferably less than about 25 nm, preferably less than about 20 nm, preferably less than about 15 nm, preferably 10 nm, preferably 5 nm.

For some applications, preferably the agent has a $K_a$ value of less than about 100 nm, preferably less than about 75 nm, preferably less than about 50 nm, preferably less than about 25 nm, preferably less than about 20 nm, preferably less than about 15 nm, preferably 10 nm, preferably 5 nm.

For some applications, preferably the agent has at least about a 100 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 150 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 200 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 250 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 300 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 350 fold selectivity to the desired target.

For some applications, the agent may be a vasoactive agent.

## POTENTIATING cGMP

As used herein with reference to cGMP, the term "potentiating" includes any one or more of: increasing the effectiveness of cGMP, increasing the levels of cGMP, increasing the activity of cGMP, decreasing the level of cGMP degradation, decreasing the level of cGMP inhibition.

The potentiating effect can be a direct effect. Alternatively, it could be a secondary effect and/or a downstream effect.

Here, preferably, the agent that potentiates cGMP acts on a $I_{cGMP}$ and/or an $AM_{cGMP}$ wherein the modulator of cGMP has an adverse effect on cGMP, such that the agent reduces and/or eliminates and/or masks and/or diverts the detrimental effect of the $I_{cGMP}$ and/or the $AM_{cGMP}$ towards cGMP.

Hence, the present invention encompasses a combination of one or more $I:I_{cAMP}$ and one or more $I:I_{cGMP}$.

In one aspect, the $I:I_{cGMP}$ is a $I:PDE_{cGMP}$.

## $I_{cAMP}$ AND/OR $AM_{cAMP}$

We have shown that cAMP mediates vaginal blood flow and by enhancing cAMP signalling we can enhance vaginal blood flow in an animal model. Thus, an agent that upregulates/enhances cAMP-mediated vasorelaxation will be efficacious in the treatment of FSAD. For ease of reference, we refer to these substances as $I_{cAMP}$ and/or an $AM_{cAMP}$. Here, the $I_{cAMP}$ and the $AM_{cAMP}$ have an adverse effect on cAMP levels or activity.

Thus, the agent may be any one of more of: an $I:I_{cAMP}$ and/or an $I:AM_{cAMP}$.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

Examples of $I_{cAMP}$ and the $AM_{cAMP}$ include one or more of PDE(s), NPY and NEP, or any component associated therewith. The associated component may be, for example, a receptor and/or a co-factor.

Thus, preferably the agent may be any one of more of: an $I:PDE_{cAMP}$, an I:NPY, an I:NPY $Y_{n}$,, and I:NEP.

Likewise, the agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

## I:I$_{cAMP}$ AND/OR I:AM$_{cAMP}$

In accordance with the present invention we have found that it is possible to treat and/or prevent FSAD by using an agent that reduces and/or eliminates and/or masks and/or diverts and/or prevents the detrimental effect of the I$_{cAMP}$ and/or the AM$_{cAMP}$ towards cAMP. The agent may even restore cAMP levels that were decreased by the a I$_{cAMP}$ and/or a AM$_{cAMP}$. For ease, we refer to these substances as I:I$_{cAMP}$ and/or a I:AM$_{cAMP}$. Here, the I:I$_{cAMP}$ and the I:AM$_{cAMP}$ prevent or reduce the adverse effect on cAMP levels or activity.

Thus, in one preferred aspect, the agent is an I:I$_{cAMP}$ and/or an I:AM$_{cAMP}$ wherein the AM$_{cAMP}$ has a detrimental effect on AM$_{cAMP}$.

In a preferred aspect, the agent may be one or more of:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$ (where n denotes an appropriate class or sub-class)
I:NPY
I:NPY Y$_n$ (where n denotes an appropriate class or sub-class)I:NEP

## A$_{cAMP}$

In accordance with the present invention, we have found that one of the important causes of FSAD is due to low levels or low activity of cAMP in the female genitalia.

Thus, the agent may be a U:A$_{cAMP}$.

Examples of A$_{cAMP}$ include VIP and AC, or any component associated therewith. The associated component may be, for example, a receptor and/or a co-factor.

Thus, preferably the agent may be any one of more of: A:AC, A:VIPr, A:VIP$_n$, I:I:VIPr or I:I:VIP$_n$.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

### U:A$_{cAMP}$

In another respect, preferably, the target is a component that increases the level of cAMP. Hence, the agent can be an U:AC

By way of example, the target could be cAMP itself or AC or VIP (or combinations thereof).

Hence, by way of example, the agent can be any one of : an U:A$_{cAMP}$, an A:AC, an A:VIPr, an A:VIP$_n$, an I:I:VIPr or an I:I:VIP$_n$.

### COMBINATION OF I:I$_{cAMP}$ AND/OR I:M$_{cAMP}$ AND/OR U:A$_{cAMP}$

In another aspect, the agent of the present invention may even be a combination of cAMP potentiators. By way of example, the agent of the present invention may be two or more of:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$.

## COMBINATION OF cAMP Mimetic and I:I$_{cAMP}$ AND/OR I:M$_{cAMP}$ AND/OR U:A$_{cAMP}$

In another aspect, the agent of the present invention may even be a combination of a cAMP mimetic and one or more cAMP potentiators. By way of example, the agent of the present invention may be a cAMP mimetic and one or more of:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$.

## INHIBITOR

The term "inhibitor" as used herein with respect to the agent of the present invention means an agent that can reduce and/or eliminate and/or mask and/or prevent the detrimental action of a I$_{cAMP}$ and/or a detrimental M$_{cAMP}$ towards cAMP. The inhibitor may act as an antagonist.

## ACTIVATOR

The term "activator" as used herein with respect to the agent of the present invention means an agent that can increase and/or produce and/or unmask and/or elevate and/or ensure action of cAMP and/or an A$_{cAMP}$. The activator may act as an agonist.

## OTHER ACTIVE COMPONENTS

In another aspect, the agent of the present invention may even be in combination with one or more other active components - such as one or more agents capable of potentiating cGMP.

## AMINO ACID SEQUENCE

As used herein, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "polypeptide" and/or the term "protein". In some instances, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "peptide". In some instances, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "protein".

The amino acid sequence may be prepared isolated from a suitable source, or it may be made synthetically or it may be prepared by use of recombinant DNA techniques.

In one aspect, the present invention provides an amino acid sequence that is capable of acting as a target in an assay for the identification of one or more agents and/or derivatives thereof capable of affecting the amino acid sequence in order to potentiate cAMP to treat FSAD.

## NUCLEOTIDE SEQUENCE

As used herein, the term "nucleotide sequence" is synonymous with the term "polynucleotide".

The nucleotide sequence may be DNA or RNA of genomic or synthetic or of recombinant origin. The nucleotide sequence may be double-stranded or single-stranded whether representing the sense or antisense strand or combinations thereof.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is DNA.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is prepared by use of recombinant DNA techniques (e.g. recombinant DNA).

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is cDNA.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence may be the same as the naturally occurring form for this aspect.

In one aspect, the present invention provides a nucleotide sequence encoding a substance capable of acting as a target in an assay (such as a yeast two hybrid assay) for the identification of one or more agents and/or derivatives thereof capable of affecting the substance in order to potentiate cAMP to treat FSAD.

## VARIANTS/HOMOLOGUES/DERIVATIVES

In addition to the specific amino acid sequences and nucleotide sequences mentioned herein, the present invention also encompasses the use of variants, homologue and derivatives thereof. Here, the term "homology" can be equated with "identity".

In the present context, an homologous sequence is taken to include an amino acid sequence which may be at least 75, 85 or 90% identical, preferably at least 95 or 98% identical. In particular, homology should typically be considered with respect to those regions of the sequence (such as amino acids at positions 51, 56 and 57) known to be essential for an activity. Although homology can also be considered in terms of similarity (i.e. amino acid residues having similar chemical properties/functions), in the context of the present invention it is preferred to express homology in terms of sequence identity.

Homology comparisons can be conducted by eye, or more usually, with the aid of readily available sequence comparison programs. These commercially available computer programs can calculate % homology between two or more sequences.

% homology may be calculated over contiguous sequences, i.e. one sequence is aligned with the other sequence and each amino acid in one sequence is directly compared with the corresponding amino acid in the other sequence, one residue at a time. This is called an "ungapped" alignment. Typically, such ungapped alignments are performed only over a relatively short number of residues.

Although this is a very simple and consistent method, it fails to take into consideration that, for example, in an otherwise identical pair of sequences, one insertion or deletion will cause the following amino acid residues to be put out of alignment, thus potentially resulting in a large reduction in % homology when a global alignment is performed. Consequently, most sequence comparison methods are designed to produce optimal alignments that take into consideration possible insertions and deletions without penalising unduly the overall homology score. This is achieved by inserting "gaps" in the sequence alignment to try to maximise local homology.

260

However, these more complex methods assign "gap penalties" to each gap that occurs in the alignment so that, for the same number of identical amino acids, a sequence alignment with as few gaps as possible - reflecting higher relatedness between the two compared sequences - will achieve a higher score than one with many gaps. "Affine gap costs" are typically used that charge a relatively high cost for the existence of a gap and a smaller penalty for each subsequent residue in the gap. This is the most commonly used gap scoring system. High gap penalties will of course produce optimised alignments with fewer gaps. Most alignment programs allow the gap penalties to be modified. However, it is preferred to use the default values when using such software for sequence comparisons. For example when using the GCG Wisconsin Bestfit package (see below) the default gap penalty for amino acid sequences is -12 for a gap and -4 for each extension.

Calculation of maximum % homology therefore firstly requires the production of an optimal alignment, taking into consideration gap penalties. A suitable computer program for carrying out such an alignment is the GCG Wisconsin Bestfit package (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Examples of other software than can perform sequence comparisons include, but are not limited to, the BLAST package (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* – Chapter 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 403-410) and the GENEWORKS suite of comparison tools. Both BLAST and FASTA are available for offline and online searching (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, pages 7-58 to 7-60). However it is preferred to use the GCG Bestfit program.

Although the final % homology can be measured in terms of identity, the alignment process itself is typically not based on an all-or-nothing pair comparison. Instead, a scaled similarity score matrix is generally used that assigns scores to each pairwise comparison based on chemical similarity or evolutionary distance. An example of such a matrix commonly used is the BLOSUM62 matrix - the default matrix for the BLAST suite of programs. GCG Wisconsin programs generally use either the public default values or a custom symbol comparison table if supplied (see user manual for further details). It is preferred to use the public default values for the GCG package, or in the case of other software, the default matrix, such as BLOSUM62.

Once the software has produced an optimal alignment, it is possible to calculate % homology, preferably % sequence identity. The software typically does this as part of the sequence comparison and generates a numerical result.

The sequences may also have deletions, insertions or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent substance. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solublity, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues as long as the secondary binding activity of the substance is retained. For example, negatively charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine, valine, glycine, alanine, asparagine, glutamine, serine, threonine, phenylalanine, and tyrosine.

Conservative substitutions may be made, for example according to the Table below. Amino acids in the same block in the second column and preferably in the same line in the third column may be substituted for each other:

| | | |
|---|---|---|
| ALIPHATIC | Non-polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar - uncharged | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar - charged | D E |
| | | K R |
| AROMATIC | | H F W Y |

EXPRESSION VECTORS

The nucleotide sequence for use as the target or for expressing the target can be incorporated into a recombinant replicable vector. The vector may be used to replicate and express the nucleotide sequence in and/or from a compatible host cell. Expression may be controlled using control sequences which include promoters/enhancers and other expression regulation signals. Prokaryotic promoters and promoters functional in eukaryotic cells may be used. Tissue specific or stimuli specific promoters may be used. Chimeric promoters may also be used comprising sequence elements from two or more different promoters described above.

The protein produced by a host recombinant cell by expression of the nucleotide sequence may be secreted or may be contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. The coding sequences can be designed with signal sequences which direct secretion of the substance coding sequences through a particular prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

## FUSION PROTEINS

The target amino acid sequence may be produced as a fusion protein, for example to aid in extraction and purification. Examples of fusion protein partners include glutathione-S-transferase (GST), 6xHis, GAL4 (DNA binding and/or transcriptional activation domains) and β-galactosidase. It may also be convenient to include a proteolytic cleavage site between the fusion protein partner and the protein sequence of interest to allow removal of fusion protein sequences. Preferably the fusion protein will not hinder the activity of the target.

The fusion protein may comprise an antigen or an antigenic determinant fused to the substance of the present invention. In this embodiment, the fusion protein may be a non-naturally occurring fusion protein comprising a substance which may act as an adjuvant in the sense of providing a generalised stimulation of the immune system. The antigen or antigenic determinant may be attached to either the amino or carboxy terminus of the substance.

In another embodiment of the invention, the amino acid sequence may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, for screening of peptide libraries for agents capable of affecting the substance activity, it may be useful to encode a chimeric substance expressing a heterologous epitope that is recognized by a commercially available antibody.

## ANTIBODIES

In one embodiment of the present invention, the agent of the present invention may be an antibody. In addition, or in the alternative, the target of the present invention may be an antibody.

Antibodies may be produced by standard techniques, such as by immunisation with the substance of the invention or by using a phage display library.

For the purposes of this invention, the term "antibody", unless specified to the contrary, includes but is not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments and fragments produced by a Fab expression library. Such fragments include fragments of whole antibodies which retain their binding activity for a target substance, Fv, F(ab') and F(ab')$_2$ fragments, as well as single chain antibodies (scFv), fusion proteins and other synthetic proteins which comprise the antigen-binding site of the antibody. Furthermore, the antibodies and fragments thereof may be humanised antibodies, for example as described in substance-A-239400. Neutralizing antibodies, i.e., those which inhibit biological activity of the substance polypeptides, are especially preferred for diagnostics and therapeutics.

If polyclonal antibodies are desired, a selected mammal (e.g., mouse, rabbit, goat, horse, etc.) is immunised with an immunogenic polypeptide bearing a epitope(s) obtainable from an identified agent and/or substance of the present invention. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminium hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are potentially useful human adjuvants which may be employed if purified the substance polypeptide is administered to immunologically compromised individuals for the purpose of stimulating systemic defence.

Serum from the immunised animal is collected and treated according to known procedures. If serum containing polyclonal antibodies to an epitope obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention contains antibodies to other antigens, the polyclonal antibodies can be purified by immunoaffinity chromatography. Techniques for producing and processing polyclonal antisera are known in the art. In order that such antibodies may be made, the invention also provides polypeptides of the invention or fragments thereof haptenised to another polypeptide for use as immunogens in animals or humans.

Monoclonal antibodies directed against epitopes obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention can also be readily produced by one skilled in the art. The general methodology for making monoclonal antibodies by hybridomas is well known. Immortal antibody-producing cell lines can be created by

262

cell fusion, and also by other techniques such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. Panels of monoclonal antibodies produced against orbit epitopes can be screened for various properties; i.e., for isotype and epitope affinity.

Monoclonal antibodies to the substance and/or identified agent of the present invention may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique originally described by Koehler and Milstein (1975 Nature 256:495-497), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor *et al* (1983) Immunol Today 4:72; Cote *et al* (1983) Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030) and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al* (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, pp 77-96). In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (Morrison *et al* (1984) Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855; Neuberger *et al* (1984) Nature 312:604-608; Takeda *et al* (1985) Nature 314:452-454). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (US Patent No. 4,946,779) can be adapted to produce the substance specific single chain antibodies.

Antibodies, both monoclonal and polyclonal, which are directed against epitopes obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention are particularly useful in diagnosis, and those which are neutralising are useful in passive immunotherapy. Monoclonal antibodies, in particular, may be used to raise anti-idiotype antibodies. Anti-idiotype antibodies are immunoglobulins which carry an "internal image" of the substance and/or agent against which protection is desired. Techniques for raising anti-idiotype antibodies are known in the art. These anti-idiotype antibodies may also be useful in therapy.

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in Orlandi *et al* (1989, Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837), and Winter G and Milstein C (1991; Nature 349:293-299).

Antibody fragments which contain specific binding sites for the substance may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, the

F(ab')$_2$ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')$_2$ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (Huse WD *et al* (1989) Science 256:1275-128 1).

## REPORTERS

A wide variety of reporters may be used in the assay methods (as well as screens) of the present invention with preferred reporters providing conveniently detectable signals (eg. by spectroscopy). By way of example, a reporter gene may encode an enzyme which catalyses a reaction which alters light absorption properties.

Examples of reporter molecules include but are not limited to β-galactosidase, invertase, green fluorescent protein, luciferase, chloramphenicol, acetyltransferase, β-glucuronidase, exo-glucanase and glucoamylase. Alternatively, radiolabelled or fluorescent tag-labelled nucleotides can be incorporated into nascent transcripts which are then identified when bound to oligonucleotide probes.

In one preferred embodiment, the production of the reporter molecule is measured by the enzymatic activity of the reporter gene product, such as β-galactosidase.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of the target, such as by using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the protein, are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA) and fluorescent activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilising monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on PDE polypeptides is preferred, but a competitive binding assay may be employed. These and other assays are described, among other places, in Hampton R *et al* (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul MN) and Maddox DE *et al* (1983, J Exp Med 15 8:121 1).

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic and amino acid assays. Means for producing labelled hybridisation or PCR probes for detecting the target polynucleotide sequences include oligolabelling, nick translation, end-labelling or PCR amplification

263

using a labelled nucleotide. Alternatively, the PDE coding sequence, or any portion of it, may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3 or SP6 and labelled nucleotides.

A number of companies such as Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI), and US Biochemical Corp (Cleveland, OH) supply commercial kits and protocols for these procedures. Suitable reporter molecules or labels include those radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles and the like. Patents teaching the use of such labels include US-A-3817837; US-A-3850752; US-A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 and US-A-4366241. Also, recombinant immunoglobulins may be produced as shown in US-A-4816567.

Additional methods to quantify the expression of a particular molecule include radiolabeling (Melby PC *et al* 1993 J Immunol Methods 159:235-44) or biotinylating (Duplaa C *et al* 1993 Anal Biochem 229-36) nucleotides, coamplification of a control nucleic acid, and standard curves onto which the experimental results are interpolated. Quantification of multiple samples may be speeded up by running the assay in an ELISA format where the oligomer of interest is presented in various dilutions and a spectrophotometric or calorimetric response gives rapid quantification.

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, its presence and expression should be confirmed. For example, if the nucleotide sequence is inserted within a marker gene sequence, recombinant cells containing the same may be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a target coding sequence under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the target as well.

Alternatively, host cells which contain the coding sequence for the target and express the target coding regions may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridisation and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane-based, solution-based, or chip-based technologies for the detection and/or quantification of the nucleic acid or protein.

## GENERAL ASSAYS FOR cAMP ACTIVITY/LEVELS

The ability of a test agent to potentiate cAMP may be determined by measuring a relevant increase or decrease of a target level. In addition, or in the alternative, the ability of a test agent to potentiate cAMP may be determined by measuring a relevant increase in cAMP levels. By way of example, one may adapt the teachings of Smith *et al* 1993 (Appl. Biochem. Biotechnol. 41:189-218). There are also commercially available immunoassay kits for the measurement of cAMP (eg Amersham International, Arlington Heights, IL and DuPont, Boston, MA). Details on a suitable cAMP assay are provided in the Experimental Section.

## SCREENS

Any one or more of appropriate targets - such as an amino acid sequence and/or nucleotide sequence - may be used for identifying a $P_{cAMP}$ in any of a variety of drug screening techniques. The target employed in such a test may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The abolition of target activity or the formation of binding complexes between the target and the agent being tested may be measured.

Techniques for drug screening may be based on the method described in Geysen, European Patent Application 84/03564, published on September 13, 1984. In summary, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with a suitable target or fragment thereof and washed. Bound entities are then detected - such as by appropriately adapting methods well known in the art. A purified target can also be coated directly onto plates for use in a drug screening techniques. Alternatively, non-neutralising antibodies can be used to capture the peptide and immobilise it on a solid support.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralising antibodies capable of binding a target specifically compete with a test compound for binding to a target.

264 扌

Another technique for screening provides for high throughput screening (HTS) of agents having suitable binding affinity to the substances and is based upon the method described in detail in WO 84/03564.

It is expected that the assay methods of the present invention will be suitable for both small and large-scale screening of test compounds as well as in quantitative assays.

Thus, the present invention also relates to a method of identifying agents that potentiate cAMP, the method comprising contacting a suitable target with the agent and then measuring the activity and/or levels of cAMP.

The present invention also relates to a method of identifying agents that selectively potentiate cAMP in female sexual genitalia, the method comprising contacting a suitable target from female sexual genitalia and then measuring the activity and/or levels of cAMP.

The present invention also relates to a method of identifying agents that potentiate cAMP, the method comprising contacting a suitable target with the agent and then measuring the activity and/or levels of the target.

The present invention also relates to a method of identifying agents that selectively potentiate cAMP in female sexual genitalia, the method comprising contacting a suitable target from female sexual genitalia and then measuring the activity and/or levels of the target.

## DIAGNOSTICS

The present invention also provides a diagnostic composition or kit for the detection of a pre-disposition for FSAD. In this respect, the composition or kit will comprise an entity that is capable of indicating the presence of one or more - or even the absence of one or more - of the targets in a test sample. Preferably, the test sample is obtained from the female sexual genitalia or a secretion thereof or therefrom.

By way of example, the diagnostic composition may comprise any one of the nucleotide sequences mentioned herein or a variant, homologue, fragment or derivative thereof, or a sequence capable of hybridising to all or part of any one of the nucleotide sequence.

In order to provide a basis for the diagnosis of disease, normal or standard values from a target should be established. This may be accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with an antibody to a target under conditions suitable for complex formation which are well known in the art. The amount of standard complex formation may be quantified by comparing it to a dilution series of positive controls where a known amount of antibody is combined with known concentrations of a purified target. Then, standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from subjects potentially affected by FSAD. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state.

A target itself, or any part thereof, may provide the basis for a diagnostic and/or a therapeutic compound. For diagnostic purposes, target polynucleotide sequences may be used to detect and quantify gene expression in conditions, disorders or diseases in which FSAD may be implicated.

The target encoding polynucleotide sequence may be used for the diagnosis of FSAD resulting from expression of the target. For example, polynucleotide sequences encoding a target may be used in hybridisation or PCR assays of tissues from biopsies or autopsies or biological fluids, to detect abnormalities in target expression. The form of such qualitative or quantitative methods may include Southern or northern analysis, dot blot or other membrane-based technologies; PCR technologies; dip stick, pin or chip technologies; and ELISA or other multiple sample formal technologies. All of these techniques are well known in the art and are in fact the basis of many commercially available diagnostic kits.

Such assays may be tailored to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regime and may be used in animal studies, in clinical trials, or in monitoring the treatment of an individual patient. In order to provide a basis for the diagnosis of disease, a normal or standard profile for target expression should be established. This is accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with the target or a portion thereof, under conditions suitable for hybridisation or amplification. Standard hybridisation may be quantified by comparing the values obtained for normal subjects with a dilution series of positive controls run in the same experiment where a known amount of purified target is used. Standard values obtained from normal samples may be compared

265

with values obtained from samples from subjects potentially affected by a disorder or disease related to expression of the target coding sequence. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state. If disease is established, an existing therapeutic agent is administered, and treatment profile or values may be generated. Finally, the assay may be repeated on a regular basis to evaluate whether the values progress toward or return to the normal or standard pattern. Successive treatment profiles may be used to show the efficacy of treatment over a period of several days or several months.

Thus, in one aspect, the present invention relates to the use of a target polypeptide, or variant, homologue, fragment or derivative thereof, to produce anti-target antibodies which can, for example, be used diagnostically to detect and quantify target levels in an FSAD states.

The present invention further provides diagnostic assays and kits for the detection of a target in cells and tissues comprising a purified target which may be used as a positive control, and anti-target antibodies. Such antibodies may be used in solution-based, membrane-based, or tissue-based technologies to detect any disease state or condition related to the expression of target protein or expression of deletions or a variant, homologue, fragment or derivative thereof.

## PROBES

Another aspect of the subject invention is the provision of nucleic acid hybridisation or PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding a target coding region or closely related molecules, such as alleles. The specificity of the probe, i.e., whether it is derived from a highly conserved, conserved or non-conserved region or domain, and the stringency of the hybridisation or amplification (high, intermediate or low) will determine whether the probe identifies only naturally occurring target coding sequence, or related sequences. Probes for the detection of related nucleic acid sequences are selected from conserved or highly conserved nucleotide regions of target family members and such probes may be used in a pool of degenerate probes. For the detection of identical nucleic acid sequences, or where maximum specificity is desired, nucleic acid probes are selected from the non-conserved nucleotide regions or unique regions of the target polynucleotides. As used herein, the term "non-conserved nucleotide region" refers to a nucleotide region that is unique to a target coding sequence disclosed herein and does not occur in related family members.

PCR as described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188 provides additional uses for oligonucleotides based upon target sequences. Such oligomers are generally chemically synthesized, but they may be generated enzymatically or produced from a recombinant source. Oligomers generally comprise two nucleotide sequences, one with sense orientation (5'->3') and one with antisense (3'<-5') employed under optimised conditions for identification of a specific gene or condition. The same two oligomers, nested sets of oligomers, or even a degenerate pool of oligomers may be employed under less stringent conditions for detection and/or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

The nucleic acid sequence for a target can also be used to generate hybridisation probes as previously described, for mapping the endogenous genomic sequence. The sequence may be mapped to a particular chromosome or to a specific region of the chromosome using well known techniques. These include *in situ* hybridisation to chromosomal spreads (Verma *et al* (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York City), flow-sorted chromosomal preparations, or artificial chromosome constructions such as YACs, bacterial artificial chromosomes (BACs), bacterial PI constructions or single chromosome cDNA libraries.

*In situ* hybridisation of chromosomal preparations and physical mapping techniques such as linkage analysis using established chromosomal markers are invaluable in extending genetic maps. Examples of genetic maps can be found in Science (1995; 270:410f and 1994; 265:1981f). Often the placement of a gene on the chromosome of another mammalian species may reveal associated markers even if the number or arm of a particular human chromosome is not known. New sequences can be assigned to chromosomal arms, or parts thereof, by physical mapping. This provides valuable information to investigators searching for disease genes using positional cloning or other gene discovery techniques. Once a disease or syndrome has been crudely localised by genetic linkage to a particular genomic region any sequences mapping to that area may represent associated or regulatory genes for further investigation. The nucleotide sequence of the subject invention may also be used to detect differences in the chromosomal location due to translocation, inversion, etc. between normal, carrier or affected individuals.

266

## HOST CELLS

The term "host cell" - in relation to the present invention includes any cell that could comprise the target for the agent of the present invention.

Thus, a further embodiment of the present invention provides host cells transformed or transfected with a polynucleotide that is or expresses the target of the present invention. Preferably said polynucleotide is carried in a vector for the replication and expression of polynucleotides that are to be the target or are to express the target. The cells will be chosen to be compatible with the said vector and may for example be prokaryotic (for example bacterial), fungal, yeast or plant cells.

The gram-negative bacterium *E. coli* is widely used as a host for heterologous gene expression. However, large amounts of heterologous protein tend to accumulate inside the cell. Subsequent purification of the desired protein from the bulk of *E.coli* intracellular proteins can sometimes be difficult.

In contrast to *E.coli*, bacteria from the genus *Bacillus* are very suitable as heterologous hosts because of their capability to secrete proteins into the culture medium. Other bacteria suitable as hosts are those from the genera *Streptomyces* and *Pseudomonas*.

Depending on the nature of the polynucleotide encoding the polypeptide of the present invention, and/or the desirability for further processing of the expressed protein, eukaryotic hosts such as yeasts or other fungi may be preferred. In general, yeast cells are preferred over fungal cells because they are easier to manipulate. However, some proteins are either poorly secreted from the yeast cell, or in some cases are not processed properly (e.g. hyperglycosylation in yeast). In these instances, a different fungal host organism should be selected.

Examples of suitable expression hosts within the scope of the present invention are fungi such as *Aspergillus* species (such as those described in EP-A-0184438 and EP-A-0284603) and *Trichoderma* species; bacteria such as *Bacillus* species (such as those described in EP-A-0134048 and EP-A-0253455), *Streptomyces* species and *Pseudomonas* species; and yeasts such as *Kluyveromyces* species (such as those described in EP-A-0096430 and EP-A-0301670) and *Saccharomyces* species. By way of example, typical expression hosts may be selected from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger var. tubigenis*, *Aspergillus niger var. awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus orvzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae.*

The use of suitable host cells - such as yeast, fungal and plant host cells - may provide for post-translational modifications (e.g. myristoylation, glycosylation, truncation, lapidation and tyrosine, serine or threonine phosphorylation) as may be needed to confer optimal biological activity on recombinant expression products of the present invention.

## ORGANISM

The term "organism" in relation to the present invention includes any organism that could comprise the target according to the present invention and/or products obtained therefrom. Examples of organisms may include a fungus, yeast or a plant.

The term "transgenic organism" in relation to the present invention includes any organism that comprises the target according to the present invention and/or products obtained.

## TRANSFORMATION OF HOST CELLS/HOST ORGANISMS

As indicated earlier, the host organism can be a prokaryotic or a eukaryotic organism. Examples of suitable prokaryotic hosts include *E. coli* and *Bacillus subtilis*. Teachings on the transformation of prokaryotic hosts is well documented in the art, for example see Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) and Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

If a prokaryotic host is used then the nucleotide sequence may need to be suitably modified before transformation - such as by removal of introns.

In another embodiment the transgenic organism can be a yeast. In this regard, yeast have also been widely used as a vehicle for heterologous gene expression. The species *Saccharomyces cerevisiae* has a long history of industrial use, including its use

2b7 ⱡ

for heterologous gene expression. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* has been reviewed by Goodey et al (1987, Yeast Biotechnology, D R Berry et al, eds, pp 401-429, Allen and Unwin, London) and by King et al (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E F Walton and G T Yarronton, eds, pp 107-133, Blackie, Glasgow).

For several reasons *Saccharomyces cerevisiae* is well suited for heterologous gene expression. First, it is non-pathogenic to humans and it is incapable of producing certain endotoxins. Second, it has a long history of safe use following centuries of commercial exploitation for various purposes. This has led to wide public acceptability. Third, the extensive commercial use and research devoted to the organism has resulted in a wealth of knowledge about the genetics and physiology as well as large-scale fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*.

A review of the principles of heterologous gene expression in Saccharomyces cerevisiae and secretion of gene products is given by E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", Yeasts, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.).

Several types of yeast vectors are available, including integrative vectors, which require recombination with the host genome for their maintenance, and autonomously replicating plasmid vectors.

In order to prepare the transgenic Saccharomyces, expression constructs are prepared by inserting the nucleotide sequence of the present invention into a construct designed for expression in yeast. Several types of constructs used for heterologous expression have been developed. The constructs contain a promoter active in yeast fused to the nucleotide sequence of the present invention, usually a promoter of yeast origin, such as the GAL1 promoter, is used. Usually a signal sequence of yeast origin, such as the sequence encoding the SUC2 signal peptide, is used. A terminator active in yeast ends the expression system.

For the transformation of yeast several transformation protocols have been developed. For example, a transgenic Saccharomyces according to the present invention can be prepared by following the teachings of Hinnen et al (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929); Beggs, J D (1978, Nature, London, 275, 104); and Ito, H et al (1983, J Bacteriology 153, 163-168).

The transformed yeast cells are selected using various selective markers. Among the markers used for transformation are a number of auxotrophic markers such as LEU2, HIS4 and TRP1, and dominant antibiotic resistance markers such as aminoglycoside antibiotic markers, eg G418.

Another host organism is a plant. The basic principle in the construction of genetically modified plants is to insert genetic information in the plant genome so as to obtain a stable maintenance of the inserted genetic material. Several techniques exist for inserting the genetic information, the two main principles being direct introduction of the genetic information and introduction of the genetic information by use of a vector system. A review of the general techniques may be found in articles by Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) and Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994 17-27). Further teachings on plant transformation may be found in EP-A-0449375.

Thus, the present invention also provides a method of transforming a host cell with a nucleotide sequence that is to be the target or is to express the target. Host cells transformed with the nucleotide sequence may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the encoded protein from cell culture. The protein produced by a recombinant cell may be secreted or may be contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing coding sequences can be designed with signal sequences which direct secretion of the coding sequences through a particular prokaryotic or eukaryotic cell membrane. Other recombinant constructions may join the coding sequence to nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins (Kroll *DJ et al* (1993) DNA Cell Biol 12:441-53).

## PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising administering a therapeutically effective amount of the agent of the present invention and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipients (including combinations thereof).

268

The pharmaceutical compositions may be for human or animal usage in human and veterinary medicine and will typically comprise any one or more of a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, or excipient. Acceptable carriers or diluents for therapeutic use are well known in the pharmaceutical art, and are described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). The choice of pharmaceutical carrier, excipient or diluent can be selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice. The pharmaceutical compositions may comprise as - or in addition to - the carrier, excipient or diluent any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s), solubilising agent(s).

Preservatives, stabilizers, dyes and even flavoring agents may be provided in the pharmaceutical composition. Examples of preservatives include sodium benzoate, sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid. Antioxidants and suspending agents may be also used.

There may be different composition/formulation requirements dependent on the different delivery systems. By way of example, the pharmaceutical composition of the present invention may be formulated to be delivered using a mini-pump or by a mucosal route, for example, as a nasal spray or aerosol for inhalation or ingestable solution, or parenterally in which the composition is formulated by an injectable form, for delivery, by, for example, an intravenous, intramuscular or subcutaneous route. Alternatively, the formulation may be designed to be delivered by both routes.

Where the agent is to be delivered mucosally through the gastrointestinal mucosa, it should be able to remain stable during transit though the gastrointestinal tract; for example, it should be resistant to proteolytic degradation, stable at acid pH and resistant to the detergent effects of bile.

Where appropriate, the pharmaceutical compositions can be administered by inhalation, in the form of a suppository or pessary, topically in the form of a lotion, solution, cream, ointment or dusting powder, by use of a skin patch, orally in the form of tablets containing excipients such as starch or lactose, or in capsules or ovules either alone or in admixture with excipients, or in the form of elixirs, solutions or suspensions containing flavouring or colouring agents, or they can be injected parenterally, for example intravenously, intramuscularly or subcutaneously. For parenteral administration, the compositions may be best used in the form of a sterile aqueous solution which may contain other substances, for example enough salts or monosaccharides to make the solution isotonic with blood. For buccal or sublingual administration the compositions may be administered in the form of tablets or lozenges which can be formulated in a conventional manner.

Preferably, the agent is in a form that is suitable for oral delivery.

## ADMINISTRATION

Typically, a physician will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual subject and it will vary with the age, weight and response of the particular patient. The dosages below are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited.

The compositions of the present invention may be administered by direct injection. The composition may be formulated for parenteral, mucosal, intramuscular, intravenous, subcutaneous, intraocular or transdermal administration. Depending upon the nned, the agent may be administered at a dose of from 0.01 to 30 mg/kg body weight, such as from 0.1 to 10 mg/kg, more preferably from 0.1 to 1 mg/kg body weight.

The term "administered" includes delivery by viral or non-viral techniques. Viral delivery mechanisms include but are not limited to adenoviral vectors, adeno-associated viral (AAV) vectos, herpes viral vectors, retroviral vectors, lentiviral vectors, and baculoviral vectors. Non-viral delivery mechanisms include lipid mediated transfection, liposomes, immunoliposomes, lipofectin, cationic facial amphiphiles (CFAs) and combinations thereof. The routes for such delivery mechanisms include but are not limited to mucosal, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, topical, or sublingual routes.

The term "administered" includes but is not limited to delivery by a mucosal route, for example, as a nasal spray or aerosol for inhalation or as an ingestable solution; a parenteral route where delivery is by an injectable form, such as, for example, an intravenous, intramuscular or subcutaneous route.

For some applications, preferably the agent is administered orally.

For some applications, preferably the agent is administered topically.

ANIMAL TEST MODELS

*In vivo* models may be used to investigate and/or design therapies or therapeutic agents to treat FSAD. The models could be used to investigate the effect of various tools/lead compounds on a variety of paramaters which indicate the sexual arousal response.

There are a number of animal models for vasculogenic female sexual dysfunction (FSAD) available that could be used.

By way of example, reference may be made to invasive animal models (e.g. see Park *et al.*, 1997). Here, vaginal and clitoral haemodynamic responses can be directly recorded following pelvic nerve stimulation in normal and atherosclerotic female rabbits (a validated model of FSAD). The *in vivo* effects of cAMP potentiators - such as vasodilatory agents such as NPY antagonist or VIP agonists - can be investigated either in normal or FSAD animals.

By way of further example, reference may be made to non-invasive animal models (e.g. see the review of Goldstein *et al.*, 1998; Laan *et al.*, 1998). Here, pulsed wave Doppler ultrasonography provides a means of detecting blood flow changes in the vaginal and clitoral arteries. This model can be used to investigate vasculogenic effects during pharmacological administration of vasodilators.

Other non-invasive techniques that can be used include vaginal photoplethysmography, which provides a quantitative measure of vaginal mucosa engorgement, and vaginal thermal clearance techniques, which are based on the principle that vaginal blood flow changes can be recorded by measuring the heat transfer away from an intravaginal probe kept at a constant temperature.

In a preferred aspect, a non-invasive model of FSAD is used.

## AN ANIMAL MODEL OF SEXUAL AROUSAL

In our studies we have developed a robust reproducible model of the physiology of sexual arousal. This model uses an anaesthetised rabbit and employs Laser Doppler technologies to monitor genital blood flow whilst routinely recording cardiovascular parameters. We are capable of measuring small changes in vaginal blood flow induced by pelvic nerve stimulation or infusion of VIP in the absence and presence of test agents.

We believe that our animal model directly reflects the clinical data. Hence, this model can be used to study candidate agents for the treatment of FSAD, such as measuring enhancement of vaginal blood flow.

## PHYSIOLOGICAL MEASUREMENT OF FEMALE SEXUAL AROUSAL

In accordance with the present invention, a number of different techniques may be used for measuring clitoral and vaginal blood flow. By way of example, use may be made of vaginal photoplethysmography, vaginal heat washout technique, clitoral and vaginal contrast-enhanced MRI, clitoral/vulval laser Doppler pulsed imaging, and clitoral ultrasonography.

Quantification of vaginal lubrication may also be measured by techniques known in the art - such as (a) pre- and post-stimulation weighing of vaginal tampons, and (b) measuring the pH of vaginal fluid. With respect to the latter aspect, the normal resting acid medium in the vagina becomes more alkaline as it approaches blood pH when transudation of fluid occurs during sexual stimulation.

## PDE (phosphodiesterase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is a PDE (phosphodiesterase).

It is known that cyclic nucleotides, such as cAMP and cGMP, are important intracellular second messengers. Cyclic nucleotide phosphodiesterases - otherwise known as PDEs - are a family of enzymes that catalyse the degradation of cyclic nucleotides and, in doing so, are one of the cellular components that regulate the concentration of cyclic nucleotides.

270

In recent years, at least seven PDE enzymes (such as PDEI - PDEVII), as well as many subtypes of these enzymes, have been defined based on substrate affinity and cofactor requirements (Beavo JA and Reifsnyder DH, Trends Pharmacol. Sci. 11:150 [1990]; Beavo J, In: Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action., Beavo J and Housley MD (Eds.). Wiley:Chichester, pp. 3-15 [1990]).

Examples of PDEs include: PDEI which is a $Ca^{2+}$/Calmodulin-dependent PDE; PDEII which is a cAMP and cGMP stimulated PDE; PDEIII which is a cGMP inhibited PDE; PDEIV which is a high affinity cAMP-specific PDE; and PDEV which is a cGMP specific PDE. PDEI etc. are sometimes called PDE type I etc. or PDE type 1 etc.

Each PDE family may contain two or more isoforms (i.e. there may be two or more PDE isoenzymes). By way of example, mammalian PDE IV, the homologue of the *Drosophila* Dunce gene (Chen CN *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 83:9313 [1986]), is known to have four isoforms in the rat (Swinnen JV *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 86:5325 [1989]). Human PDEs are also known to occur as isoforms and have splice variants. For example, the cloning of one human isoform of PDEIV from monocytes was reported in 1990 (Livi GP *et al.*, Mol. Cell. Bio., 10:2678 [1990]). By way of further example, other workers have independently cloned three splice variants of PDEIV, which are now designated hPDEIV-B1, hPDEIV-B2, and hPDEIV-B3.

Teachings on cyclic nucleotide phosphodiesterases can also be found in US-A-5932423 and US-A-5932465.

Teachings on a further cyclic nucleotide phosphodiesterase - namely CN PCDE8 - can be found in WO-A-97/35989. According to WO-A-97/35989, CN PCDE8 has two isozymes - which were designated CN PCDE8A and CN PCDE8B. The term "isozyme" is sometimes referred to in the art as "isoform".

According to WO-A-97/35989, many inhibitors of different PDEs have been identified and some have undergone clinical evaluation. For example, PDEIII inhibitors are being developed as antithrombotic agents, as antihypertensive agents and as cardiotonic agents useful in the treatment of congestive heart failure. Rolipram, a PDEIII inhibitor, has been used in the treatment of depression and other inhibitors of PDEIII are undergoing evaluation as anti-inflammatory agents. Rolipram has also been shown to inhibit lipopolysaccharide (LPS) induced TNF-alpha which has been shown to enhance HIV-1 replication *in vitro*. Therefore, rolipram may inhibit HIV-1 replication (Angel *et al* 1995 AIDS 9:1137-44). Additionally, based on its ability to suppress the production of TNF alpha and beta and interferon gamma, rolipram has been shown to be effective in the treatment of encephalomyelitis, the experimental animal model for multiple sclerosis (Sommer *et al*, 1995 Nat Med 1:244-248) and may be effective in the treatment of tardive dyskinesia (Sasaki *et al*, 1995 Eur J Phamacol 282:71-76).

According to WO-A-97/35989, there are also non-specific PDE inhibitors such as theophylline, used in the treatment of bronchial asthma and other respiratory diseases, and pentoxifylline, used in the treatment of intermittent claudication and diabetes-induced peripheral vascular disease. Theophylline is thought to act on airway smooth muscle function as well as in an anti-inflammatory or immunomodulatory capacity in the treatment of respiratory diseases (Banner *et al* 1995 Respir J 8:996-1000) where it is thought to act by inhibiting both CN PDE cAMP and cGMP hydrolysis (Banner *et al* 1995 Monaldi Arch Chest Dis 50:286-292). Pentoxifylline, also known to block TNF-alpha production, may inhibit HIV-1 replication (Angel *et al supra*). A list of CN PDE inhibitors is given in Beavo 1995 *supra*.

It has been suggested that selective inhibitors of PDEs, in addition to their isozymes and their subtypes, will lead to more effective therapy with fewer side effects. For example, see the teachings in the reviews of Wieshaar RE *et al*, (J. Med. Chem., 28:537 [1985]), Giembycz MA (Biochem. Pharm., 43:2041 [1992]) and Lowe JA and Cheng JB (Drugs of the Future, 17:799-807 [1992]).

Thus, for some applications it is desirable to have a selective inhibition of an individual type of PDE.

Background teachings on PDEs have been presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning PDE2 or cGMP-stimulated PDE, has been extracted from that source.

"Cyclic nucleotides serve as second messengers that mediate a variety of cellular responses to extracellular signals such as hormones, light, and neurotransmitters. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) play a role in signal transduction by regulating the cellular concentrations of cyclic nucleotides. Mammalian cells contain multiple PDEs that are distinguished into at least 7 families based on their substrate affinity and on their selective sensitivity to cofactors and inhibitory drugs. These families are: (I) Ca(2+)/calmodulin-dependent PDEs; (II) cGMP-stimulated PDEs; (III) cGMP-inhibited PDEs; (IV) cAMP-specific PDEs; (V) cGMP-specific PDEs; (VI) photoreceptor PDEs; and (VII) high-affinity, cAMP-specific. From the amino acid sequences, it is evident that all these PDE families contain a related domain, thought to be the catalytic domain, with approximately 30% sequence identity between families. Members of the same family are more closely related; they share 60 to 80% sequence identity throughout the entire coding region.

Michaeli et al. (1993) established a highly sensitive functional screen for the isolation of cDNAs encoding cAMP phosphodiesterases by complementation of defects in the Saccharomyces cerevisiae strain lacking both endogenous cAMP PDE genes, PDE1 and PDE2. Three groups of cDNAs corresponding to 3 distinct human genes encoding cAMP-specific PDEs were isolated from a human glioblastoma cDNA library using this functional screen. Two of the genes were closely related to the Drosophila 'dunce' cAMP-specific PDE. The third gene, which Michaeli et al. (1993) referred to as HCP1, encoded a novel cAMP-specific PDE. HCP1 had an amino acid sequence related to the sequences of the catalytic domains of all cyclic nucleotide PDEs. It is a high-affinity cAMP-specific PDE that does not share other properties of the cAMP-specific PDE family, however. The PDE activity of HCP1 was not sensitive to cGMP or other inhibitors of the cGMP-inhibitable PDEs. The biochemical and pharmacologic properties of HCP1 suggested to Michaeli et al. (1993) that it is a member of a previously undiscovered cyclic nucleotide PDE family, which they designated as family VII. Northern blot analysis indicated the presence of high levels of an HCP1 RNA in human skeletal muscle.

By Southern blot analysis of somatic cell hybrid lines, Milatovich et al. (1994) mapped the HCP1 locus to chromosome 8; by study of somatic cell hybrid lines that contained different regions of chromosome 8, they regionalized the assignment to 8q13-q22. Han et al. (1998) mapped the PDE7A gene to 8q13 by fluorescence in situ hybridization. By interspecific backcross analysis, they mapped the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3."

Background teachings on PDE2 have been presented by Jennifer P. Macke et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning PDE2 cGMP-stimulated has been extracted from that source.

> "Rosman et al. (1997) cloned a cDNA corresponding to human PDE2A. The PDE2A gene encodes a 941 amino acid polypeptide with a predicted molecular mass of 106 kD. The protein sequence is 90% identical to bovine and rat PDE2A sequences. Northern blot analysis showed that PDE2A was expressed as a 4.2-kb mRNA at varying levels in all human tissues tested, with greatest expression in brain. Expression studies revealed that PDE2A hydrolyzes cAMP and cGMP and is inhibited by the PDE2A-specific inhibitor EHNA."

Nucleotide sequences and amino acid sequences for PDEs are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

In one aspect, the PDE target is selected from any one or more of the following PDE enzymes: $PDE_{cAMP}$ 1, $PDE_{cAMP}$ 2, $PDE_{cAMP}$ 3, $PDE_{cAMP}$ 4, $PDE_{cAMP}$ 7 and $PDE_{cAMP}$ 8.

In a more preferred aspect, the PDE target is selected from any one or more of the following PDE enzymes: $PDE_{cAMP}$ 1, $PDE_{cAMP}$ 2, $PDE_{cAMP}$ 3, and $PDE_{cAMP}$ 4.

Preferably, for the present invention, the PDE to target is at least PDE 2.

NEP (neutral endopeptidase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is NEP.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for NEP is available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

In one aspect, the NEP is NEP (EC 3.4.24.11) (also known as enkephalinase or endopeptidase-2). Here, we have found NEP EC 3.4.24.11 mRNA and expressed protein in human and rabbit vagina.

Here, we believe that in females including those suffering from FSAD, VIP is degraded by NEP EC3.4.24.11. Thus, NEP inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of VIP released during arousal. This will lead to a treatment of

272

FSAD, such as through enhanced vaginal engorgement. We have shown that selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 enhance pelvic nerve-stimulated and VIP-induced increases in vaginal blood flow. In addition that selective NEP inhibitors enhance VIP and nerve-mediated relaxations of isolated vagina wall.

Background teachings on NEP have been presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning NEP has been extracted from that source.

> "Common acute lymphocytic leukemia antigen is an important cell surface marker in the diagnosis of human acute lymphocytic leukemia (ALL). It is present on leukemic cells of pre-B phenotype, which represent 85% of cases of ALL. CALLA is not restricted to leukemic cells, however, and is found on a variety of normal tissues. CALLA is a glycoprotein that is particularly abundant in kidney, where it is present on the brush border of proximal tubules and on glomerular epithelium. Letarte et al. (1988) cloned a cDNA coding for CALLA and showed that the amino acid sequence deduced from the cDNA sequence is identical to that of human membrane-associated neutral endopeptidase (NEP; EC 3.4.24.11 ), also known as enkephalinase. NEP cleaves peptides at the amino side of hydrophobic residues and inactivates several peptide hormones including glucagon, enkephalins, substance P, neurotensin, oxytocin, and bradykinin. By cDNA transfection analysis, Shipp et al. (1989) confirmed that CALLA is a functional neutral endopeptidase of the type that has previously been called enkephalinase. Barker et al. (1989) demonstrated that the CALLA gene, which encodes a 100-kD type II transmembrane glycoprotein, exists in a single copy of greater than 45 kb which is not rearranged in malignancies expressing cell surface CALLA. The gene was located to human chromosome 3 by study of somatic cell hybrids and in situ hybridization regionalized the location to 3q21-q27. Tran-Paterson et al. (1989) also assigned the gene to chromosome 3 by Southern blot analysis of DNA from human-rodent somatic cell hybrids. D'Adamio et al. (1989) demonstrated that the CALLA gene spans more than 80 kb and is composed of 24 exons."

NPY (neuropeptide Y)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is NPY or one of its associated receptors.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for NPY and its receptors are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

Here, we have found that neuropeptide Y (NPY) exerts an inhibitory regulatory influence over vasoactive intestinal peptide (VIP)-mediated vasorelaxation.Thus, inhibition of NPY receptors will result in an increased pelvic nerve and VIP-mediated *increases in vaginal blood flow ie take the break off vasorelaxation. Clinically this will* lead to increased vaginal engorgement which will ultimately lead to increased lubrication *via* plasma transudation and increased vaginal compliance. Hence, a suitable target for the treatment of FSAD is NPY or one of its associated receptors.

Thus, in one preferred aspect, the agent is an NPY $Y_1$ $Y_2$ or $Y_5$ antagonist, preferably an oral NPY $Y_1$ $Y_2$ or $Y_5$ antagonist. This agent will treat FSAD by increasing vaginal blood flow and increasing lubrication.

The NPY-mediated antagonism of VIP-induced increases in blood flow therefore represents a potential therapeutic target by which blood flow in the female genital tract can be influenced. The mechanism through which this antagonism occurs is most likely through NPY $Y_1$ receptor-induced $G_{i/o}$ activation. In other physiological systems NPY $Y_1$ receptors have been implicated in mediating vasoconstriction and inhibiting sympathetic transmitter release (Lundberg *et al.*, 1996; a NPY $Y_2$ effect can not be excluded). We believe in the female genital tract that NPY inhibits vasorelaxation via direct inhibition of adenylate cyclase direct inhibiting VIP release or sympathetic neurotransmission.

As indicated, a $P_{cAMP}$ target is one of the NPY receptors.

The neuronal release of NPY regulates the VIP-induced vasorelaxation of the vaginal vascular bed. This most likely occurs *via* a presynaptic mechanism involving NPY $Y_1$ receptors, although a post-synaptic mode of action can not be excluded. An NPY antagonist will potentiate VIP-induced vasodilation of the vaginal vascular beds.

Clinically this will lead to increased vaginal lubrication and compliance *via* vaginal wall engorgement.

NPY receptor expression studies performed by us have identified NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes within the human vagina.

Hence, in one aspect, the $P_{cAMP}$ target is one or more of the NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes.

Background teachings on NPY and it associated receptors have been prepared by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning NPY has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY) is an abundant and widespread peptide in the mammalian nervous system. It shows sequence homology to peptide YY and over 50% homology in amino acid and nucleotide sequence to pancreatic polypeptide (PNP; 167780). NPY is a 36-amino acid peptide. Minth et al. (1984) cloned the NPY gene starting from mRNA of a pheochromocytoma. Takeuchi et al. (1985, 1986) isolated cDNA clones of the NPY and PNP genes from a pheochromocytoma and a pancreatic endocrine tumor, respectively. Using these cDNA probes to analyze genomic DNA from chromosome assignment panels of human-mouse somatic cell hybrids, they then examined the question of whether the genes are syntenic. The studies showed nonsynteny, with NPY on 7pter-7q22 and PNP on 17p11.1-17qter. By studies of a backcross with Mus spretus, Bahary et al. (1991) mapped the homologous NPY gene to mouse chromosome 6. Since mouse chromosome 6 has homology to human 7q, it is likely that the NPY gene in man is located in the region 7cen-q22. Meisler et al. (1987) excluded close linkage between the loci for cystic fibrosis (219700) and neuropeptide Y. Terenghi et al. (1987) determined the distribution of mRNA encoding NPY in neurons of the cerebral cortex in surgical biopsy specimens and postmortem brain by means of in situ hybridization techniques. They showed consistent localization of NPY gene transcription and expression in normal mature cortical neurons. Baker et al. (1995) showed by fluorescence in situ hybridization that the NPY gene is located on 7p15.1 and exists in single copy. They commented that NPY is one of the most highly conserved peptides known, with, for example, only 3 amino acid differences between human and shark. Neuropeptide Y is a neuromodulator implicated in the control of energy balance and is overproduced in the hypothalamus of ob/ob mice. To determine the role of NPY in the response to leptin (164160) deficiency, Erickson et al. (1996) generated ob/ob mice deficient in NPY. In the absence of NPY, ob/ob mice were less obese because of reduced food

intake and increased energy expenditure, and were less severely affected by diabetes, sterility, and somatotropic defects. These results were interpreted as indicating that NPY is a central effector of leptin deficiency. Genetic linkage analysis of rats that were selectively bred for alcohol preference identified a chromosomal region that included the NPY gene (Carr et al., 1998). Alcohol-preferring rats had lower levels of NPY in several brain regions compared with alcohol-nonpreferring rats. Thiele et al. (1998) therefore studied alcohol consumption by mice that completely lacked NPY as a result of targeted gene disruption (Erickson et al., 1996). They found that NPY-deficient mice showed increased consumption, compared with wildtype mice, of solutions containing 6%, 10%, and 20% (by volume) ethanol. NPY-deficient mice were also less sensitive to the sedative/hypnotic effects of ethanol, as shown by more rapid recovery from ethanol-induced sleep, even though plasma ethanol concentrations did not differ significantly from those of controls. In contrast, transgenic mice that overexpressed a labeled NPY gene in neurons that usually express it had a lower preference for ethanol and were more sensitive to the sedative/hypnotic effects of ethanol than controls. These data provided direct evidence that alcohol consumption and resistance are inversely related to NPY levels in the brain. As part of an on-going study of the genetic basis of obesity, Karvonen et al. (1998) identified a 1128T-C polymorphism that resulted in substitution of leucine by proline at residue 7 in the signal peptide part of pre-pro-NPY. This polymorphism was not associated with obesity or energy metabolism, but was significantly and consistently associated with high serum total and LDL cholesterol levels both in normal-weight and obese Finns and in obese Dutch subjects. Uusitupa et al. (1998) found the pro7 polymorphism in 14% of Finns but in only 6% of Dutchmen. Subjects with pro7 in NPY had, on average, 0.6 to 1.4 mmol/L higher serum total cholesterol levels than those without this gene variant. As the impact of pro7 NPY on serum cholesterol levels could not be found in normal-weight Dutchmen, it can be assumed that obese persons may be more susceptible to the effect of the gene variant. It was calculated that the probability of having the pro7 in NPY could be as high as 50 to 60% in obese subjects with a total serum cholesterol equal to or higher than 8 mmol/L. At least among Finns, the pro7 form of NPY is one of the strongest genetic factors affecting serum cholesterol levels. SEE ALSO Allen and Bloom (1986) ; Dockray (1986) ; Maccarrone and Jarrott (1986) ; Minth et al. (1986)."

As indicated background teachings on NPY and it associated receptors have been prepared by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning NPYR1 has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY; 162640) is one of the most abundant neuropeptides in the mammalian nervous system and exhibits a diverse range of important physiologic activities, including effects on psychomotor activity, food intake, regulation of central endocrine secretion, and potent vasoactive effects on the cardiovascular system. Two major subtypes of NPY (Y1 and Y2) have been defined by pharmacologic criteria. The NPY Y1 receptors have been identified in a variety of tissues, including brain, spleen, small intestine, kidney, testis, placenta, and aortic smooth muscle. The Y2 receptor is found mainly in the central nervous system. Herzog et al. (1992) reported cloning of a cDNA encoding a human NPY receptor which they confirmed to be a member of the G protein-coupled receptor superfamily. When expressed in Chinese hamster ovary (CHO) or human embryonic kidney cells, the receptor exhibited characteristic ligand specificity. In the kidney cell line, the receptor was coupled to a pertussis toxin-sensitive G protein that mediated the inhibition of cyclic AMP accumulation. In the CHO cell line, on the other hand, the receptor was coupled not to inhibition of adenylate cyclase but rather to the elevation of intracellular calcium. Thus the second messenger coupling of the NPY receptor was cell type specific, depending on the specific repertoire of G proteins and effector systems present in the cell type. Larhammar et al. (1992) independently cloned and characterized the neuropeptide Y receptor. Herzog et al. (1993) determined the molecular organization and regulation of the human NPY Y1 receptor gene. In contrast to the contiguous structure of most G protein-coupled receptor genes, they found that the NPY Y1 receptor gene has 3 exons. They also identified a common PstI polymorphism in the first intron of the gene. By high resolution fluorescence in situ hybridization, they localized the gene to 4q31.3-q32. Herzog et al. (1997) found that the NPY1R and NPY5R (602001) genes are colocalized on chromosome 4q31-q32. The 2 genes are transcribed in opposite directions from a common promoter region. One of the alternately spliced 5-prime exons of the Y1 receptor gene is a part of the coding sequence of the Y5 receptor. This unusual arrangement suggested to Herzog et al. (1997) that the 2 genes arose by a gene duplication event and that they may be coordinately expressed. By interspecific backcross analysis, Lutz et al. (1997) mapped the Npy1r and Npy2r genes to conserved linkage groups on mouse chromosomes 8 and 3, respectively, which correspond to the distal region of human chromosome 4q."

As indicated background teachings on NPY and it associated receptors has been prepared by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning NPYR2 has been extracted from that source.

"Neuropeptide Y (NPY) signals through a family of G protein-coupled receptors present in the brain and sympathetic neurons. At least 3 types of neuropeptide Y receptor have been defined on the basis of pharmacologic criteria, tissue distribution, and structure of the encoding gene; see 162641 and 162643. Rose et al. (1995) reported the expression cloning in COS cells of a cDNA for the human type 2 receptor, NPY2R. Transfected cells showed high affinity for NPY (162640), peptide YY (PYY; 600781), and a fragment of NPY including amino acids 13 to 36. The predicted 381-amino acid protein has 7 transmembrane domains characteristic of G protein-coupled receptors and is only 31% identical to the human Y1 receptor (NPY1R; 162641). A 4-kb mRNA was detected on Northern blots of tissue samples from several regions of the nervous system. Gerald et al. (1995) cloned the cDNA corresponding to the human Y2 receptor from a human hippocampal cDNA expression library using a radiolabeled PYY-binding assay. They expressed the Y2 gene in COS-7 cells and performed a hormone-binding assay which showed that the Y2 receptor binds (from highest to lowest affinity) PYY, NPY, and pancreatic polypeptide (PP; 167780) hormones. Ammar et al. (1996) cloned and characterized the human gene encoding the type 2 NPY receptor. The transcript spans 9 kb of genomic sequence and is encoded in 2 exons. As in the type 1 NPY receptor gene, the 5-prime untranslated region of NPY2R is interrupted by a 4.5-kb intervening sequence. Ammar et al. (1996) demonstrated by Southern analysis of rodent-human cell hybrids followed by fluorescence in situ hybridization (FISH) that the NPY2R gene maps to 4q31, the same region containing the NPY1R gene, suggesting that these subtypes may have arisen by gene duplication despite their structural differences. By interspecific backcross analysis, Lutz et al. (1997) mapped the Npy1r and Npy2r genes to conserved linkage groups on mouse chromosomes 8 and 3, respectively, which correspond to the distal region of human chromosome 4q."

VIP (vasoactive intestinal peptide)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is VIP or one of its associated receptors. Current classification/nomenclature refers to these as VPAC1, VPAC2 and PACAP).

Nucleotide sequences and amino acid sequences for VIP and its receptors are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

We have shown that VPAC1and VPAC2 are present in human and rabbit vagina. PACAP was absent from both rabbit and human vagina.

VIP is the major endogenous neurotransmitter released during sexual arousal that is responsible for nerve-induced vaginal vasodilation of the vascular beds located in the vaginal wall. These vasodilatory effects are mediated by adenylate cyclase activation and cAMP production. Without wishing to be bound by theory, this effect may be mediated via VIP receptor subtypes $VPAC_1$, $VPAC_2$ or PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) receptors. $VPAC_2$ and PACAP receptors are not expressed outside of the CNS and the receptors despite being expressed in the pituitary, appears to have no widespread biological function.

The agent of the present invention could potentiate VIP and/or act as a VIP mimetic. The agent would then potentiate and/or mimic the vasorelaxant effects of endogenous VIP released during sexual arousal. The agent may also have an additive effect on VIP-induced relaxations of vaginal smooth muscle. Clinically this will lead to FSAD treatment, though increased vaginal lubrication *via* vaginal wall engorgement and compliance.

A suitable agent may be a VIP analogue.

Background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning VIP has been extracted from that source.

"Vasoactive intestinal peptide (VIP), a 28-amino acid peptide originally isolated from porcine duodenum, is present not only in gastrointestinal tissues but also in neural tissues, possibly as a neurotransmitter, and exhibits a wide variety of biological actions. Because VIP shows similarities to glucagon, secretin and gastric inhibitory peptide (GIP), it has been considered a member of the glucagon-secretin family. The primary translation product of the mRNA encoding VIP (prepro-VIP) has a molecular weight of 20 daltons. By cloning the DNA sequence complementary to the mRNA coding for human VIP, Itoh et al. (1983) found that the VIP precursor contains not only VIP but also a novel peptide of 27 amino acids, designated PHM27, that has aminoterminal histidine and carboxyterminal methionine. It differs from PHI17 isolated from porcine intestine by 2 amino acids; PHI27, as its designation indicates, has carboxyterminal isoleucine. Linder et al. (1987) isolated the human gene for VIP and PHM27 and studied its expression in various tissues of the rat. Heinz-Erian et al. (1985) suggested that deficient innovation of sweat glands of cystic fibrosis patients by the VIP neuropeptide might be a basic mechanism for the decreased water content and relative impermeability of the epithelium to chloride and other ions that characterize cystic fibrosis. To test this hypothesis, Gozes et al. (1987) took the 'candidate gene' approach. Bodner et al. (1985) had shown that VIP and PHM-27 are encoded by adjacent exons. Gozes et al. (1987) used the PHM-27-encoding genomic fragment to detect the presence of the VIP gene at 6q21-qter. Thus, they eliminated a defective VIP gene as a candidate for the primary cause of cystic fibrosis (which is coded by chromosome 7). By in situ hybridization techniques, Gozes et al. (1987) assigned the VIP gene to 6q24. This placed VIP in the region of MYB (189990), which has been mapped to 6q22. Gozes et al. (1987) investigated a functional relationship between the 2 genes in neuronal tissue. They observed a sharp peak of MYB mRNA in the hippocampus of 3-day-old rats, preceding the peak of VIP mRNA that occurs in this area at 8 days of age. Omary and Kagnoff (1987) found nuclear receptors for VIP in a human colonic adenocarcinoma cell line. Gotoh et al. (1988) assigned VIP to chromosome 6 by spot blot hybridization of a molecularly cloned fragment of the gene to sorted chromosomes. The localization was refined to 6q26-q27 by in situ hybridization."

276 ⅔

As indicated, background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning VIPR1 or VPAC1 has been extracted from that source.

"Vasoactive intestinal peptide (VIP; 192320) is an octacosameric neuroendocrine mediator found predominantly in cholinergic presynaptic neurons of the central nervous system and in peripheral peptidergic neurons innervating diverse tissues. Of the many neuroendocrine peptides with immunologic functions, VIP is distinguished by its capacity to affect both B and T cells directly. Distinct subsets of neural, respiratory, gastrointestinal, and immune cells bear specific high-affinity receptors for VIP, which are associated with a guanine nucleotide-binding (G) protein capable of activating adenylate cyclase. Libert et al. (1991) obtained 4 new receptors of the G protein-coupled receptor family by selective amplification and cloning from thyroid cDNA. One of these, termed RDC1, was identified as the VIP receptor by Sreedharan et al. (1991). Libert et al. (1991) mapped the VIPR gene to 2q37 by in situ hybridization. Later information made it doubtful that the gene mapped to 2q37 was in fact the VIP receptor gene (Vassart, 1992). The sequence that was designated GPRN1 by Sreedharan et al. (1991) and mapped to 2q37 was found not to bind VIP by Wenger (1993). Sreedharan et al. (1995) isolated an authentic type I VIP receptor gene and by fluorescence in situ hybridization localized it to the 3p22 band in a region associated with small-cell lung cancer. By interspecific backcross analysis, Hashimoto et al. (1999) mapped the mouse Vipr1 gene to the distal region of chromosome 9, a region that shows homology of synteny with human chromosome 3p. Sreedharan et al. (1993) cloned a human intestinal VIP receptor gene; the deduced amino acid sequence shares 84% identity with the rat lung VIP receptor. Couvineau et al. (1994) isolated 2 VIPR cDNA clones from a human jejunal epithelial cell cDNA library. One encodes a VIP receptor consisting of 460 amino acids and having 7 putative transmembrane domains, as do other G protein-coupled receptors. The other encodes a 495-amino acid VIP receptor-related protein exhibiting 100% homology with the functional VIP receptor over the 428 amino acids at the C-terminal region, but containing a completely divergent 67-amino acid N-terminal domain. When expressed in COS-7 cells, the second protein did not bind radioiodinated VIP, although it was normally addressed at the plasma membrane as assessed by immunofluorescence studies. The type I VIP receptor, also termed type II PACAP receptor (see 102981 for another type of PACAP receptor), was found by Sreedharan et al. (1995) to span approximately 22 kb and to be comprised of 13 exons (ranging from 42 to 1,400 bp) and 12 introns (ranging from 0.3 to 6.1 kb). Sreedharan et al. (1995) also characterized the promoter and the 5-prime flanking region of the gene."

As indicated, background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning VIPR2 or VPAC2 has been extracted from that source.

> "Vasoactive intestinal peptide (VIP; 192320) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP; 102980) are homologous peptides that function as neurotransmitters and neuroendocrine hormones. While the receptors for VIP and PACAP share homology, they differ in their substrate specificities and expression patterns. See VIPR1 (192321) and ADCYAP1R1(102981). Svoboda et al. (1994) performed low stringency PCR using primers based on sequences conserved among VIP receptors. They cloned the human VIP2 receptor gene from a lymphoblast cDNA library. This gene encoded a 438-amino acid polypeptide that shares 86% identity with the rat VIP2 receptor. They expressed the human VIP2 receptor in Chinese hamster ovary cells and found that it binds to PACAP-38, PACAP-27, VIP, and helodermin, and that binding of the receptor to any of these peptides activates adenylate cyclase. Peptide binding was found to be inhibited by GTP. Adamou et al. (1995) cloned the VIP2 receptor gene from a human placenta cDNA library. Northern blotting revealed that VIPR2 is expressed as 2 transcripts of 4.6 kb and 2.3 kb at high levels in skeletal muscle and at lower levels in heart, brain, placenta, and pancreas. Mackay et al. (1996) used fluorescence in situ hybridization to map the VIPR2 gene to human chromosome 7q36.3. Further mapping with cell lines derived from patients with holoprosencephaly type 3 (HPE3; 142945) revealed that the VIPR2 gene lies within the HPE3 minimal critical region. Mackay et al. (1996) stated that although VIPR2 may contribute to the HPE3 phenotype, it is not the sole factor responsible."

## AC (adenylate cyclase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is AC.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for AC are available in the literature.

To confirm that VIP induces vasorelaxation via elevation of intracellular cAMP levels and consequent activation of adenylate cyclase we have measured vaginal cAMP concentrations during VIP stimulation and used forskolin, an adenylate cyclase activator, to mimic the effects of activating the cAMP/adenylate cyclase pathway.

In these studies, we found that VIP treatment and forskolin treatment elevate intracellular concentrations cAMP in isolated vaginal tissue.

277 ~~2~~

We also found that forskolin increases vaginal blood flow in an animal model of sexual arousal.

Additionally we found that forskolin induces relaxation in isolated vagina.

Background teachings on AC are presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning AC has been extracted from that source.

> "Adenylyl cyclase (EC 4.6.1.1 ) catalyzes the transformation of ATP into cyclic AMP. The enzymatic activity is under the control of several hormones, and different polypeptides participate in the transduction of the signal from the receptor to the catalytic moiety. Stimulatory or inhibitory receptors (Rs and Ri) interact with G proteins (Gs and Gi) that exhibit GTPase activity and they modulate the activity of the catalytic subunit of the adenylyl cyclase. Parma et al. (1991) cloned a cDNA corresponding to human brain adenylyl cyclase, symbolized by them as HBAC1. By in situ hybridization to metaphase chromosomal spreads using the human brain cDNA probe, Stengel et al. (1992) showed that the gene is located on 8q24.2. A highly homologous gene, ADCY2 (103071), was assigned to 5p15.3 by the same method."

## GENERAL RECOMBINANT DNA METHODOLOGY TECHNIQUES

Although in general the techniques mentioned herein are well known in the art, reference may be made in particular to Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) and Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. PCR is described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188.

## SUMMARY

In summation, the present invention relates to:

1. A pharmaceutical composition for subsequent use in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

2. The use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD.

3. A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

4. An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In other embodiments, the present invention relates to:

5. A pharmaceutical composition for subsequent use in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; wherein the agent is selected from any one or more of:

a cAMP mimetic
$I:PDE_{cAMP}$
$I:PDEn_{cAMP}$

I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

6. The use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is selected from any one or more of:

a cAMP mimetic
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

7. A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD, wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient, wherein the agent is selected from any one or more of:
a cAMP mimetic
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$

I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

8. An assay method for identifying an agent that treat a female suffering from FSD, in particular FSAD, the assay method comprising determining whether or not a putative agent is capable of acting as any one or more of:

a cAMP mimetic
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$

wherein if the putative agent is capable of acting as any one or more of

a cAMP mimetic
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP

279

U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$

then the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In other embodiments, the present invention relates to:

9. A pharmaceutical composition for subsequent use in enhancing vaginal blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

10. The use of an agent in the manufacture of a medicament for enhancing vaginal blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female.

11. A method of treating female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the female so as to cause enhanced vaginal blood flow.

## EXAMPLES

The present invention will now be described, by way of example only, in which reference is made to the following Figures:

Figure 1 which is a graph;
Figure 2 which is a graph;
Figure 3 which is a graph;
Figure 4 which is a graph;
Figure 5 which is a graph;
Figure 6 which is a graph;
Figure 7 which is a graph; and
Figure 8 which presents some compound formulae.

In more detail:

Figure 1:- Electrical stimulation of the pelvic nerve induces a frequency-dependent increase in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Increasing the stimulation frequency induces larger increases in blood flow. Changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 2:- Vasoactive intestinal peptide (VIP)-induces increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Figure 2a (left hand graph) illustrates how vaginal blood flow is increased in a concentration dependent manner by infusions of VIP (intravenous bolus). Figure 2b (right hand graph) demonstrates that 2 repetitive infusions of VIP produce similar increases in blood flow. Note the duration of the response is also similar. All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 3:- Vasoactive intestinal peptide (VIP) reduces the mean arterial blood pressure in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. This graph illustrates the *typical* effects of the vasoactive agents and stimulation parameters used to investigate vagina blood flow on mean arterial pressure in an anaesthetised rabbit. These observed effects are typical of the trends seen in all animals tested. VIP induced a significant depression of mean arterial pressure whereas pelvic nerve stimulation, control infusions of Hepsaline or inhibitors of $PDE_{cAMP}$ or NEP have no

effect on blood pressure. Note, the reduction in blood pressure associated with VIP infusions is also associated with a large increase in heart rate.

Figure 4:- Activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway mimics VIP mediated vasorelaxation and smooth muscle relaxation in vaginal tissue. Figure 4a illustrates that an infusion of forskolin (40nmol/kg *iv* bolus, a cAMPmimetic) induces significant increases in vaginal blood flow. Note the amplitude and duration of the response is similar to that induced by VIP (1.0μg/kg, *iv* bolus). Interestingly, the effects on blood flow have a longer duration of action on the external vaginal wall. All changes were monitored using laser Doppler technologies. Figure 4b demonstrates that both VIP (0.1μM) and forskolin (10μM) significantly elevate intracellular concentrations of cAMP above basal levels in the rabbit vagina. Figure 4c shows that forskolin induces potent relaxations of precontracted (1μM phenylephrine) rabbit vaginal strips with an $IC_{50}$~300nM. All changes were quantified using *in vivo* laser Doppler technologies, biochemical cAMP enzyme immunoassay or by *in vitro* tissue relaxation.

Figure 5:- A selective inhibitor of NEP EC 3.4.24.11 enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive PNS at 20 minute intervals induces reproducible increases in vaginal blood flow. Administration of a NEP inhibitor (7.5mg/kg, *iv* bolus; closed circles) enhances PNS-induced increases in vaginal blood flow by 53%. A control infusion of Hepsaline (open circles) has no effect on the amplitude of the responses. All changes were monitored using laser Doppler technologies. Note after the 7th stimulation (20 minutes after the NEPi *iv* bolus) the blood flow enhancement declines, this reflects the clearance and/or metabolism of the NEP inhibitor in the rabbit. By the 9th stimulation (60minutes post NEPI) the PNS-induced increases have returned to control values.

Figure 6:- Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive infusions of VIP at 30 minute intervals induce reproducible increases in vaginal blood flow (See figure 2b). An NEP inhibitor both potentiates the amplitude and prolongs the duration of enhanced blood flow when these increases are induced by submaximal doses of VIP e.g. 0.3μg/kg. At doses of VIP which induce maximal increases in vaginal blood flow eg 3μg/kg, NEP inhibitors only potentiate the duration of enhanced vaginal blood flow. VIP-induced increase in the presence of a NEP

inhibitor are shown as closed triangles whereas control VIP responses are shown as open triangles. A control infusion of Hepsaline has no effect on the amplitude of the responses. All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 7:- Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ type 2 enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive infusions of VIP at 30 minute intervals induce reproducible increases in vaginal blood flow (See figure 2b). A selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor (25µg/kg *iv* bolus) potentiates the duration of enhanced vaginal blood flow induced by VIP (3µg/kg *iv* bolus). VIP-induced increases in the presence of a $PDE_{cAMP}$ inhibitor are shown as closed triangles whereas control VIP responses are shown as open triangles. A control infusion of Hepsaline had no effect on the amplitude of the responses. All changes were monitored using Laser Doppler technologies.

## AN ASSAY FOR MEASURING cAMP ACTIVITY/LEVELS

Measurement of cAMP from vaginal tissue samples using a Biotrak cAMP Enzymeimmunoassay (EIA) kit (Amersham Life Sciences RPN 225).

cAMP levels are measured by EIA in vaginal tissue samples. The EIA is based on competition between unlabelled cAMP and a fixed quantity of peroxidase labelled cAMP for a limited amount of cAMP specific antibody.

### 1. MATERIALS

All materials are supplied by Amersham Life Science cAMP EIA kit (RPN 225) unless otherwise stated.

1.1 Microtitre plate - 96 well plate coated with donkey anti-rabbit IgG.

1.2 Assay buffer - 0.05M sodium acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. The contents of the bottle are transferred to a graduated cylinder using 3x15ml distilled water washes. The final volume is then adjusted to 500ml.

1.3 cAMP standard (for acetylation method). cAMP at 10.24pmol/ml in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Standard is dissolved in 2.5ml of assay buffer for use.

281

1.4 Antiserum. Anti-cAMP antibody in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Prior to use, antibody is diluted with 11ml assay buffer and mixed by gentle inversion to dissolve contents.

1.5 cAMP conjugate. cAMP horseradish peroxidase in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Prior to use, solution is diluted with 11ml assay buffer and mixed by gentle inversion to dissolve contents.

1.6 Wash buffer. 0.01M phosphate buffer pH7.5 containing 0.05% (v/v) Tween™ 20 upon reconstitution. The contents of the bottle are transferred to a graduated cylinder using 3x15ml distilled water washes. The final volume is then adjusted to 500ml.

1.7 TMB substrate. 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine (TMB)/ hydrogen peroxide, in 20% (v/v) dimethylformamide.

Ready for use.

1.8 Acetylation reagent. 2ml acetic anhydride, 4ml triethylamine, prepared as required.

1.9 Sulphuric acid (1M). 1M Sulphuric acid is prepared from an 18M stock (BDH). 1.11ml of acid is added to 18.8ml of distilled water, this provides enough for one plate.

## 2. SPECIFIC EQUIPMENT

2.1 Disposable 5ml glass test tubes

2.2 Spectrophotometric plate reader (Spectra max 190)

2.3 Microtitre plate shaker (Luckham R100)

## 3. METHODS

- Tissue sample preparation. The tissues were treated with the relevant pretreatment in 5ml samples of physiological salt solution eg agonists, cAMPmimetics etc. After treatment the samples were snap frozen in liquid nitrogen and then smashed using a hammer. The powder was scraped into a centrifuge tube and 1ml of 0.5M ice cold perchloric acid (PCA) was added. The sample was vortex mixed and left on ice for 1hr.

- cAMP extraction from tissue samples. The samples were centrifuged at 10000g for 5 min at 4°C. The supernatant was removed and placed in other centrifuge tubes. The pellet was keep for protein analysis at -80°C. The supernatant samples were then neutralised to pH~6 using $K_3PO_4$. Centrifuged at 10000g for 5 min at 4°C. Recover supernatant and wash 4 times with 5 volumes (5ml) of water saturated diethyl ether. The upper ether layer should be discarded after each wash. Transfer aqueous to into a short thin glass tube and dry under a steam of nitrogen at 60°C. Dissolve dried extract in 1ml of assay buffer and store in refrigerator until required (or can be frozen).
- Stock reagents are equilibrated to room temperature and working solutions then prepared
- cAMP standards are prepared in glass tubes labelled 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, and 512fmol. This is achieved by adding 1ml of assay buffer to all tubes except the 512fmol standard. 1ml of acetylation standard (10.24pmol/ml) is then added to the two top standards (256, and 512fmol). The 256fmol standard is vortexed and 1ml transferred to the 128fmol standard. his is continued until the 2fmol standard where 1ml of solution is disposed of. A zero standard tube is set up containing 1ml of assay buffer.
- Tissue extract samples are thawed on ice (if necessary) and diluted 1 in 100 (10µl sample to 990µl assay buffer) in labelled glass tubes.
- The cAMP in all standards and samples is acetylated by the addition of 100µl of acetylation reagent in a fume hood which is added down the side of the tube before immediately vortexing.
- 50µl of all standards and samples are added to the appropriate wells of the 96 well plate, and 150µl of assay buffer is added to non specific binding (NSB) wells.
- 100µl of antiserum is added to all wells except blanks (B) and NSB before incubating for 2 hours at 3-5°C.
- After incubation, 100µl of cAMP-peroxidase conjugate is added to all wells except B before a further 1 hour incubation at 3-5°C.
- Plates are emptied by turning them upside down and blotting onto absorbent paper before washing each well four times with 400µl of wash buffer. After each wash plates are re-blotted to ensure any residual wash buffer is removed. 200µl TMB is then immediately dispensed into all wells.
- Plates are put on a plate shaker for 30 minutes at room temperature before the addition of 100µl of 1M sulphuric acid into all wells. The optical density is read on Spectra max 190 at 450nm within 30 minutes.

## 4. STANDARDS

With each assay the following standard tubes are set up:-

### 4.1 Spiking a standard in assay buffer

A known amount of cAMP is spiked into assay buffer to determine the efficiency of the assay. 70pmol/ml of cAMP is added to assay buffer which is equivalent to 35fmol/well in the assay, which is in the middle of the dose response curve.

To make up 1ml of standard:- 68.4µl 521fmol/well standard
931.6µl Assay buffer

### 4. Effects of compounds on plate

Standards are set up to determine whether the compound used in the functionalstudies has any effect on the 96 well plate or affects the binding of cAMP. These include:-

- Spiking the compound into assay buffer alone to assess the effects of the compound directly on the plate.
- Spiking the compound into plasma containing basal levels of cAMP to assess the effects of the compound on the binding of cAMP to the plate.

5nM concentrations of compound are spiked into each standard. 5nM is chosen because total drug levels at the end of infusion have in the past been approximately 150-300nM. Samples are diluted 1:100 before being assayed, therefore 5nM allows for any larger than expected total drug concentrations at the end of infusion.

## 5. CALCULATIONS

The Spectra max plate reader reads the optical density (OD) at 450nm.

The standard curve is generated by plotting the %B/Bo (y axis) against cAMP fmol/well (x axis) on Spectra max.

%B/B0 (% bound) for each sample and standard is calculated as follows:-
Bo = zero standard (see methods 3.2)

$$\%B/Bo = \frac{(\text{standard or sample OD-NSB OD})}{(\text{Bo OD-NSB OD})} \times 100$$

The fmol/well volume can then be read directly from the standard curve for each sample. Values are then converted to pmol/ml before taking the mean of each pair of samples.

Conversion of values from fmol/well to pmol/ml:-

fmol to pmol = divide by 1000
Volume in well = 50µl .... So (x1000)
50
Sample is diluted 1/100, so overall = 1 x 1000/1000 x 100/50 = 2

So all fmol/well values are multiplied by 2 to give pmol/ml

## ANIMAL TEST MODEL

### POTENTIATING THE EFFECTS OF CYCLIC ADENOSINE-3',5'-MONOPHOSPHATE (cAMP) RESULTS IN INCREASES IN VAGINAL BLOOD FLOW IN THE ANAESTHETISED RABBIT MODEL OF SEXUAL AROUSAL

### 1.0 Aims

1. To develop and validate an animal model of female sexual arousal.
2. To identify the mechanism(s) responsible for the regulation of vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit.
3. To identify potential approaches for enhancement of vaginal blood flow.
4. To investigate the mechanism(s) that underlie relaxation of vaginal smooth muscle and to identify potential approaches for enhancement of vaginal relaxation.

283 $

## 2.0 Introduction

The *normal* sexual arousal response consists of a number of physiological responses that are observed during sexual excitement. These changes such as vaginal, labial and clitoral engorgement result from increases in genital blood flow. Engorgement leads to increased vaginal lubrication via plasma transudation; increased vaginal compliance (relaxation of vaginal smooth muscle) and increases in vaginal and clitoral sensitivity.

Female sexual arousal disorder (FSAD) is a highly prevalent sexual disorder affecting up to 40% of pre-, peri- and postmenopausal (±HRT) women. The primary consequence of FSAD is reduced vaginal engorgement or swelling which manifests itself as a lack of lubrication and a lack of pleasurable genital sensation. Secondary consequences include reduced sexual desire, pain during intercourse and difficulty in achieving orgasm. The most common cause of FSAD is decreased genital blood flow resulting in reduced vaginal, labial and clitoral engorgement. (Park, 1997; Goldstein, 1998; Berman, 1999a, Werbin, 1999). Our objective is to either restore, or mimic, the *normal* sexual arousal response in women suffering from FSAD, by enhancing genital blood flow.

In our studies, we have identified cAMP (cyclic adenosine-3',5'-monophosphate) as the mediator of vaginal vasorelaxation using laser Doppler technology to measure small changes in genital blood flow. This has involved developing an animal model of sexual arousal and then demonstrating that the data mimics the physiological changes observed during female sexual arousal. The model was then used to identify and validate mechanisms that enhance genital blood flow eg. direct or indirect potentiation of cAMP-mediated vasorelaxation.

## 3.0 Methods

### *3.1 Anaesthetic Protocol*

Female New Zealand rabbits (~2.5kg) were pre-medicated with a combination of Medetomidine (Domitor®) 0.5ml/kg *i.m.*, and Ketamine (Vetalar®) 0.25ml/kg *i.m.* whilst maintaining oxygen intake via a face mask. The rabbits were tracheotomised using a Portex™ uncuffed endotracheal tube 3 ID., connected to ventilator and maintained a ventilation rate of 30-40 breaths per minute, with an approximate tidal volume of 18-20 ml, and a maximum airway pressure of 10 cm $H_2O$. Anaesthesia was then switched to isoflurane and ventilation continued with $O_2$ at 2l/min. The right marginal ear vein was cannulated using a 23G or 24G catheter, and Lactated Ringer perfused at 0.5ml/min. The rabbit was maintained at 3% isoflurane during invasive surgery, dropping to 2% for maintenance anaesthesia.

### 3.2 *Cannulation of Vessels*

The left groin area of the rabbit was shaved and a vertical incision was made approximately 5cm in length along the thigh. The femoral vein and artery were exposed, isolated and then cannulated with a PVC catheter (17G) for the infusion of drugs and compounds. Cannulation was repeated for the femoral artery, inserting the catheter to a depth of 10cm to ensure that the catheter reached the abdominal aorta. This arterial catheter was linked to a Gould system to record blood pressure. Samples for blood gas analysis were also be taken via the arterial catheter. Systolic and diastolic pressures were measured, and the mean arterial pressure calculated using the formula (diastolic x2 + systolic) ÷3. Heart rate was measured via the pulse oxymeter and *Poh-Ne-Mah* system.

### 3.3 *Stimulation of the Pelvic Nerve*

A ventral midline incision was made into the abdominal cavity. The incision was about 5cm in length just above the pubis. The fat and muscle was *bluntly* dissected away to reveal the hypogastric nerve which runs down the body cavity. It was desirable to keep close to the side curve of the pubis wall in order to avoid damaging the femoral vein and artery which lie above the pubis. The sciatic and pelvic nerves lie deeper and were located after further dissection on the dorsal side of the rabbit. Once the sciatic nerve is identified, the pelvic nerve was easily located. We found that stimulation of the nerve causes an increase in vaginal blood flow, and innervation of the pelvic region. The pelvic nerve was freed away from surrounding tissue and a *Harvard* bipolar stimulating electrode was placed around the nerve. The nerve was slightly lifted to give some tension, then the electrode was secured in position. Approximately 1ml of light paraffin oil was placed around the nerve and electrode. This acts as a protective lubrication to the nerve and prevents blood contamination of the electrode. The electrode was connected to a *Grass* S88 Stimulator. The pelvic nerve was stimulated using the following parameters:- 20V,

284

pulse width 0.5ms, duration of stimulus 10 seconds and a frequency range of 2 to 16Hz. Reproducible responses were obtained when the nerve was stimulated every 15-20 minutes.

A frequency response curve was determined at the start of each experiment in order to determine the optimum frequency to use as a sub-maximal response, normally 4Hz. The compound(s) to be tested were infused, via the femoral vein, using a *Harvard* 22 infusion pump allowing a continuous 15 minute stimulation cycle.

### 3.4 *Positioning of the Laser Doppler Probes*

A ventral midline incision was made, at the caudal end of the pubis, to expose the pubic area. The external vaginal wall was exposed by removing any connective tissue. One laser Doppler flow probe was inserted 3cm into the vagina, so that half the probe shaft is still visible. The position of these probes was then adjusted until a signal was obtained. A second probe was placed just above the surface of a blood vessel on the external vaginal wall. Both probes were clamped in position.

Vaginal blood flow was recorded either as numbers directly from the Flowmeter, or indirectly from Gould chart recorder trace. Calibration is set at the beginning of the experiment (0-62.5ml/min/100g tissue).

### 3.5 *Infusion of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)*

The doses of VIP (Bachem, H-3775) infused were 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 µg/kg *i.v.* and were infused in a volume of 0.5 ml of saline. VIP was infused using a Harvard 22 pump, infusing at 500µl/min via a 3-way tap into the femoral vein. After VIP infusion, the catheter was flushed with heparinised saline (Hepsaline) so that no VIP was left in the catheter.

For experiments using VIP infusions, there was a need for an initial sensitising dose (10nM), in order that reproducible responses could be obtained. An initial infusion of Hepsaline (50UI/ml) was infused to act as a negative control.

### 3.6 *Infusion of Inhibitors*

NEP (Neutral Endopeptidase EC3.4.24.11) inhibitors, phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors and PDE2 inhibitors were made up in 5% glucose solution (200µl 50% glucose in 1.8ml water for injection). The inhibitors were infused at the same rate as VIP. NEP inhibitors were left for 30 minutes prior to a VIP dose response curve, whilst PDE5 and PDE2 inhibitors were left for 15 minutes.

### 3.7 *Measurement of smooth muscle relaxation in isolated rabbit vagina*

3.7 (a). Rabbit vagina *in vitro* preparation:- Female New Zealand white rabbits (2.0 - 3.0 kg) were killed by cervical dislocation. The abdominal cavity was opened and the vagina excised. Tissue strips were mounted longitudinally in Wesley Co. 5ml silanised organ chambers with braided silk sutures (6/0 gauge) at an initial resting tension of 1.5g in Krebs bicarbonate buffer maintained at 37°C and gassed with 95%$O_2$/5%$CO_2$. The upper ligature of each tissue strip was attached to a 10g capacity force-displacement transducer and changes in isometric force were measured and recorded using a DART *in vitro* data capture system. Tissues were allowed to equilibrate for 1.5 hours and were regularly washed with Krebs.

3.7 (b). Vasoactive intestinal peptide-induced relaxation of rabbit vagina:- Each tissue was contracted using 1µM bath concentration of phenylephrine. When the contractile response reached a stable plateau (~15 minutes), VIP was cumulatively added to the organ chamber at log units to produce concentrations from 0.1 - 100nM. The relaxation responses were measured 5 minutes after the addition of each concentration of VIP; maximum relaxation was achieved by this time. Tissues then received either a test agent (eg NEP or PDE inhibitor) or DMSO vehicle (time matched control).

3.7 (c). Analysis of data for VIP relaxation experiments:- For each VIP concentration relaxation-response curve, the relaxation responses induced by VIP were expressed as a percentage of the maximum phenylephrine induced contraction. These values were then plotted against log VIP concentration and sigmoidal curves were fitted. For the purpose of curve fitting the minimum relaxation response was constrained to 0 % and the maximum relaxation response was allowed to free fit. The concentration of VIP required to produce 50 % relaxation of the phenylephrine contraction ($EC_{50\ PE}$) was determined.

3.7 (d). Electrical field stimulated relaxation of rabbit vagina:- Rabbit vaginal strips were prepared as described in Section 3.7 (a). The tissue strips were mounted between two platinum electrodes placed at the top and bottom of the organ chamber approximately 4cm apart. Each tissue was contracted using 1μM bath concentration of phenylephrine. When the contractile response reached a stable plateau (15 minutes), the tissues underwent a pre-treatment electrical field stimulated (EFS) induced relaxation curve. This was performed between 40 - 60 volts using sequential frequencies of 2, 4, 8 and 16 Hz delivered as 10 second trains of 0.5 milli second pulse width. The tissues were allowed to return to base line pre-contractile tension between each frequency (5 minutes) and the size of the relaxation response recorded.

After completion of the pre-treatment EFS response curve, all tissues were washed for 15 minutes, allowing the tissues to return to the baseline tension. Tissues then received either a test agent (eg NEP or PDE inhibitor, nitric oxide synthase [NOS] inhibitor) or DMSO vehicle (time matched control). Tissues were re-contracted with phenylephrine (1μM) 15 minutes after the addition of compound or vehicle and an EFS-induced relaxation response curve determined as described above.

For EFS experiments the Krebs was supplemented with atropine (10μM) and guanethidine (150μM) to abolish any cholinergic or adrenergic neuronal innervations of the vagina.

### 3.8 *Measurement of cAMP levels in isolated rabbit vagina*

Measurement of cAMP concentrations were made from vaginal tissue extracts using a Biotrak cAMP Enzyme immunoassay (EIA) kit (Amersham Life Sciences RPN 225). Isolated vaginal tissue samples were treated with test agents (eg forskolin or VIP). After 5 minutes the samples were snap frozen using liquid nitrogen, homogenised and cAMP was extracted. cAMP levels are measured by EIA. The EIA is based on competition between unlabelled cAMP and a fixed quantity of peroxidase labelled cAMP for a limited amount of cAMP specific antibody.

### *3.8 Measurement of phosphodiesterase (PDE) activity in isolated rabbit vagina*

Human vaginal wall cytosol extracts were obtained from ABS Inc., Delaware (Age of donors 41 and 60 years old). The PDE isoenzymes were separated by Mono-Q anion exchange chromatography and characterised based upon their substrate selectivity, sensitivity to allosteric modulators and selective inhibitors. Western analysis using specific PDE isoenzyme antibodies was also performed to detect PDE expression in the human vagina.

All data are reported as mean ± s.e.m..

## 4.0 Results and Discussion

### *4.1 Animal model of sexual arousal*

In our studies, we have developed a robust reproducible model of the physiology of sexual arousal. Using this anaesthetised rabbit model, we are capable of measuring small changes in vaginal blood flow using Laser Doppler technology. Stimulation of the pelvic nerve is used to simulate the neuronal effects of sexual arousal.

We found that stimulation of the pelvic nerve induces frequency-dependent increases in vaginal blood flow (See Figure 1). These increases are significant when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall. Stimulation of the pelvic nerve at 2Hz induced a mean maximum blood flow elevation of 10.3±1.8, at 4Hz 20.0±4.6, 8Hz 36.3±4.8 and 16Hz 46.6+4.7 ml/min/100g tissue (n=4); 15-20V, 0.5ms, 10s). These values are of similar amplitude to those previously observed in human studies and animal models of arousal (Berman, 1999a; Park, 1997).

We found that submaximal stimulation of the pelvic nerve results in reproducible increases in vaginal blood flow (eg stimulating 4Hz every 15 minutes gave a mean increase of 8.50±0.10ml/min/100g tissue n=8). This reproducibility is maintained for up to 5 hours. We can use the reproducibility of these responses to investigate a.) the identity of endogenous vasoactive agents/mechanisms which mediate vaginal engorgement, and b.) the influence of drugs which may be efficacious in enhancing vaginal blood flow.

We found that there are no adverse cardiovascular effects associated with pelvic nerve stimulation in the anaesthetised rabbit (See Figure 3).

Vaginal blood flow is increased during sexual arousal (Berman, 1999) via an increased arterial blood supply - the vaginal artery, the vaginal branch of the uterine artery, the internal pudendal artery and the middle branches of the middle rectal artery are all involved in supplying blood to the vagina. The pelvic nerve which originates from S2/S4 spinal regions and innervates the lower vagina and related blood vessels. By stimulating the pelvic nerve we can mimic the blood flow effects observed during sexual arousal i.e. an increase in arterial vaginal blood flow. Interestingly, the increased arterial blood flow is not mirrored by venous drainage allowing the capillary networks to become engorged with blood. Vaginal engorgement leads to vaginal lubrication, via increased plasma transudation and this is one of the first pelvic responses observed during sexual stimulation. The neurotransmitters that are released upon pelvic nerve stimulation or during sexual arousal are currently unidentified. Nerves containing neuropeptides and other neurotransmitter candidates that innervate the vasculature and microvasculature of the vagina have been identified immunohistochemically. These studies indicate that calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NPY), nitric oxide synthase (NOS), substance P and vasoactive intestinal peptide (VIP) are all present in the nerves that innervate the human vagina (Hoyle, 1996).

### 4.2 *Validation of the anaesthetised rabbit model of sexual arousal*

In order to translate blood flow data generated using this model to those observed in a human model of sexual arousal, we directly compared our data with vaginal blood flow and cardiovascular data generated in pre-clinical studies.

We found that VIP infusion has the following effects in rabbit model of sexual arousal:-

- Exogenous VIP (*iv* infusion) induces significant concentration-dependent increases in vaginal blood flow (See Figure 2a). These increases are significantly elevated above basal blood flow values when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall. Vaginal blood flow was significantly increased by 24.7±3.6ml/min/100g tissue with an intravenous administration of VIP (3μg/kg). The blood flow remained elevated above basal for about 11 minutes post-infusion. Lower doses induced smaller increases eg 0.3μg/kg, elevated blood flow by 7.5±1.3ml/min/100g tissue and blood flow was elevated for 7 minutes post-infusion.

- Repetitive infusions of similar doses of VIP (*iv* at 30 minute intervals) induce significant reproducible increases in vaginal blood flow (See Figure 2b).

- VIP (*iv*) significantly increases heart rate and decreases mean arterial blood pressure (See Figure 3). At 0.3μg/kg VIP (*iv*) caused significant reduction in mean arterial blood pressure of 13.2±0.7mm Hg and a significant increase in heart rate of 16±4 beats per minute.

This animal model directly reflects the clinical data ie increased vaginal blood flow, suppressed blood pressure and elevated heart rate. Therefore this model can be used to investigate the mechanism(s) that underlie physiological changes that occur during sexual arousal and additionally to validate novel approaches for the enhancement of vaginal blood flow and hence treatment of FSAD.

### *4.3 VIP-induces changes in vaginal blood flow via stimulation of the cAMP/adenylate cyclase pathway*

Ottesen and co-workers demonstrated that VIP induces increases in vaginal blood flow and lubrication in healthy volunteers. However the mechanism by which VIP exert it's effects are unclear. In the literature, there are plenty of examples of VIP signalling through different second messenger systems including cGMP/guanylate cyclase (Ashur-Fabian, 1999), carbon monoxide/heme oxygenase (Fan, 1998) and cAMP/adenylate cyclase (Schoeffter, 1985; Gu, 1992; Foda, 1995). This is exemplified by a recent report which describes how the relaxant effects of VIP in the uterine artery can be explained by the release of nitric oxide (Jovanovic, 1998). Interestingly there is also evidence for VIP modulating NO/cGMP in male urogenital function (Kim, 1994).

In this study we have shown that VIP induces vasorelaxation via elevation of intracellular cAMP levels. By conducting a series of functional experiments we have measured blood flow and smooth muscle relaxation in addition to biochemically measuring intracellular cAMP concentrations. We have used forskolin, an activator of adenylate cyclase or cAMPmimetic, to mimic the effects of activating the

287 F

cAMP/adenylate cyclase pathway. VIP and forskolin have identical effects on the physiological arousal effects on vaginal blood flow and relaxation.

VIP (1µg/kg) and forskolin (40nmol/kg) induces significant increases in vaginal blood flow 13.2 and 12.7ml/min/100mg tissue respectively (See figures 2a and 4a). These changes in amplitude induced by VIP and forskolin were not significantly different. These increases are significantly elevated above basal blood flow values when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall.

VIP (0.1µM) and forskolin (10µM) both significantly increased intracellular concentrations cAMP above basal levels in isolated vaginal tissue (See Figure 4b)..

VIP (0.1µM) and forskolin (10µM) elevate basal concentrations from 276nM by 156% and 238% respectively. The differences in these percentages reflects the difference in concentrations of VIP and forskolin used eg VIP at a concentration of 0.1µM relaxes precontracted isolated vagina by circa 80% where as 10µM forskolin is sufficient to completely relax isolated tissue.

Additionally we showed that VIP and forskolin induces relaxation in isolated vaginal tissue with $EC_{50}$ values of 18.8±0.6nM and 320±20nM respectively (See Figure 4c).

These data establish that VIP induces vaginal vasorelaxation via the cAMP/adenylate cyclase pathway, hence this model can be used to investigate whether pelvic nerve stimulation, i.e. sexual arousal, leads to the release of VIP/activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway. In addition, approaches to enhance vaginal blood flow during sexual arousal, eg by directly or indirectly enhancing cAMP signalling, can also be investigated.

### *4.4 cAMP is the mediator of vaginal vasorelaxation*

The neurotransmitter and second messenger candidates responsible for increases in vaginal blood flow during sexual arousal are currently unidentified. Todate, workers have focused on the nitric oxide (NO)/cGMP pathway. In accordance with the present invention, we have demonstrated that:- 1.) the cAMP/adenylate cyclase pathway mediates VIP-induced increases in vaginal blood flow; 2.) VIP is the endogenous neurotransmitter released during sexual arousal and 3.) endogenously released VIP induces it's vasorelaxant effects via elevation of cAMP.

Agents useful in the present invention are those that prevent the metabolism of VIP or directly enhance cAMP signalling enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow eg NEP inhibitors or $PDE_{cAMP}$ inhibitors respectively (See next section).

In our studies, we have found that we believe that we can exclude a role for NO in arousal-induced increases in vaginal blood flow. In this respect, we have shown that a potent and selective PDE type 5 inhibitor has no effect on either pelvic nerve stimulated- or VIP-induced increases in vaginal blood flow (-5.3±5.5% change in blood flow at 60μg/kg). Additionally PDE type 5 inhibitor has a minimal effect on VIP- or electrical field stimulated (EFS)- induced-relaxations of isolated vaginal smooth muscle (30% enhancement of VIP-induced relaxations; See table 1).

Table 1:- Enhancement of VIP mediated relaxation of isolated rabbit vagina. This table illustrated the percentage enhancement of the $EC_{50}$ for VIP-induced relaxations of precontracted vaginal smooth muscle (1μM phenylephrine). Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ types 1, 2, 3 and 4 all significantly potentiated VIP-mediated relaxations whereas a selective inhibitor of $PDE_{cGMP}$ type 5 or vehicle control had no effect on VIP-mediated relaxations.

| PDE inhibitor at selective dose | Percentage enhancement of VIP-induced relaxation |
|---|---|
| $PDE_{cAMP}$ type 1 | 210% |
| $PDE_{cAMP}$ type 2 | 130% |
| $PDE_{cAMP}$ type 3 | 220% |
| $PDE_{cAMP}$ type 4 | 160% |
| $PDE_{cGMP}$ type 5 | No effect (30%) |
| Control - vehicle | No effect |

We have shown that VIP is also the endogenous NANC (non-adrenergic, non-cholinergic) neurotransmitter partially responsible for EFS-induced relaxations of isolated vaginal smooth muscle. A high dose of a nitric oxide synthase inhibitor (L-NOARG, 300μM) only inhibits 50% of EFS-induced relaxations. A NEP inhibitor

(1µM), which will prevent NEP-induced metabolism of VIP and hence enhance VIP signalling, enhances the non-nitric oxide NANC relaxation induced by EFS. We have shown that both NO and VIP regulate smooth muscle tone in the vaginal wall. Therapeutically it will be possible to enhance relaxations of vaginal smooth muscle with agents that enhance NO/cGMP and/or VIP/cAMP mediated signalling.

### *4.5 Vaginal blood flow is enhanced by pharmacological agents that directly or indirectly elevate cAMP levels*

FSAD is associated with and may result from reduced vaginal blood flow. Potential approaches to treat this disorder revolve around enhancing vaginal blood flow. Having established that cAMP is the mediator of vaginal vasorelaxation and that elevations of cAMP result from neuronally released VIP, we believe that if cAMP signalling is enhanced, then as a consequence vaginal blood flow will be increased, hence restoring vaginal blood flow to normal levels and treating FSAD. We have initially chosen 3 targets to directly or indirectly enhance cAMP-mediated vasorelaxation - $PDE_{cAMP}$ inhibitors, NEP (EC 3.4.24.11) inhibitors and neuropeptide Y (NPY) receptor antagonists.

#### 4.5.1 Neutral Endopeptidase (NEP EC 3.4.24.11) inhibitors

NEP EC3.4.24.11 metabolises VIP and hence terminates VIP-mediated biological activity. NEP inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of VIP released during arousal. This will have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

There have been no previous literature reports of NEP EC3.4.24.11 localisation or of it's functional role in vaginal tissue or a role in sexual arousal.

Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 at clinically relevant doses significantly enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow (See Figure 5). We observed a 53% potentiation of the peak increase in vaginal blood flow induced by submaximal stimulation frequencies eg 4Hz.

Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11, at clinically relevant doses, enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow when compared to time-matched controls. At submaximal doses of VIP (eg. 0.3µg/kg) a significant potentiation in both the peak increase (95±6%) and prolongation of the duration of the enhancement (*circa* 140% - from 7 to in excess of 17 minutes; See Figure 6). NEP inhibitors significantly prolong the duration of VIP-induced elevation of vaginal blood flow when given in combination with dose of VIP that produce maximal flow increases (*circa* 80% increase in duration - 11 to 20 minutes).

NEP inhibitors at clinically relevant doses significantly enhance VIP-induced and nerve-mediated relaxations in isolated tissue. The $EC_{50}$ for VIP is significantly reduced from 18.8±0.6nM to 2.9±0.3nM in the presence of a selective NEP inhibitor (1μM). The effect of the NEP inhibitor is concentration dependent.
NEP EC 3.4.24.11 mRNA message and protein is expressed and has been identified in human and rabbit vagina by Northern and Western analyses.

4.5.2 Phosphodiesterase (PDE) inhibitors

cAMP is degraded by cAMP-hydrolysing PDEs ie. $PDE_{cAMP}$. $PDE_{cAMP}$ inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of cAMP released during arousal. This should have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

There are no literature reports of $PDE_{cAMP}$ localisation or of a functional role of these isozymes in vaginal tissue or a role in sexual arousal. We have shown by PDE profiling of human and rabbit vagina that the following $PDE_{cAMP}$ 1, 2, 3, 4, 7 & 8 isozymes are present. Inhibitors of these $PDE_{cAMP}$ represent potential agents to enhance vaginal blood flow and/or relax vaginal smooth muscle.

A selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor significantly enhanced the duration of VIP-induced increases in peak vaginal blood flow by over 100% (measured at 50% amplitude; See Figure 7). The selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor significantly enhances the peak increase in blood flow induced by pelvic nerve stimulation (circa 15±3% [200μg/kg] at 4Hz).

$PDE_{cAMP}$ inhibitors enhance VIP-induced relaxations of precontracted isolated vaginal smooth muscle (1μM phenylephrine; See Table 1). Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ types 1, 2, 3 and 4 all significantly potentiated VIP-mediated relaxations. (210% @ 76nM, 130% @ 8nM, 220% @ 3.4μM and 160% @ 686nM potentiation of VIP $EC_{50}$ values) These inhibitors were administered at dose known to be selective for the particular $PDE_{cAMP}$ of interest. A selective inhibitor of $PDE_{cGMP}$ type 5 or vehicle control had no viable effect on VIP-mediated relaxations.

### 4.5.3 NPY receptor antagonists

NPY exerts an inhibitory influence over VIP-mediated vasorelaxation and NPY receptor antagonists will facilitate the vasorelaxant effect of endogenous VIP released during arousal. This will have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

There are no literature reports of NPY receptor localisation or of a functional role for these receptors in vaginal tissue or a role in sexual arousal.

NPY receptor expression studies have identified by Northern and Western analyses that NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes are present in human and rabbit vagina.

### *4.6 Effects of agents that enhance cAMP or increase vaginal blood flow on the mean arterial blood pressure in the anaesthetised rabbit*

In the search for an oral therapy for FSAD it is desirable that that there are no associated adverse cardiovascular effects eg effect on blood pressure or heart rate. In our studies, we have found that infusions of VIP significantly reduce mean arterial blood pressure (See Figure 3) and significantly increased heart rate. Hence, in a highly preferred aspect, the agent is not VIP. Pelvic nerve stimulation and inhibitors of $PDE_{cAMP}$ and NEP however had no effect on blood pressure. At 0.3μg/kg VIP (*iv*), caused a significant reduction in mean arterial blood pressure of 13.2±0.7mm Hg and a significant increase in heart rate of 16±4 beats per minute. At higher doses such as 3.0μg/kg VIP (*iv*) caused significant reduction in mean arterial blood pressure of 14.7±1.37mm Hg and this was associated with a significant increase in heart rate of 111±30 beats per minute which then increased mean arterial blood pressure by 8.5±1.4mm Hg.

## COMPOUNDS TESTED

Figure 8 presents a series of compounds that were tested in accordance with the present invention and were found to be effective in accordance with the present invention – i.e. they can act as $P_{cAMP}$ in order to treat FSD, in particular FSAD.

In more detail:

Compound of Formula I ("FI") is 5-[4-(diethylamino)benzyl]-1-methyl-3-propyl-6,7-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one. FI may be prepared according to the teachings of EP-A-0911333 (Example 50 thereof).

Compound of Formula II ("FII") is 9-(1-acetyl-4-phenylbutyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-one. FII may be prepared according to the teachings of EP-A-0771799 (Example 100 thereof).

Compound of Formula III ("FIII") is Milrinone. FIII is a commercially available product.

Compound of Formula IV ("FIV") is Rolipram. FIV is a commercially available product.

Compound of Formula V ("FV") is cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[[1-(2-carboxy-4-pentenyl)cyclopentyl]carbonyl]amino]-,1-ethyl ester. FV may be prepared according to the teachings of EP-A-0274234 (Example 300 thereof).

Compound of Formula VI ("FVI") is cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[[1-(2-carboxy-4-pentenyl)cyclopentyl]carbonyl]amino]-. FVI may be prepared according to the teachings of EP-A-0274234 (Example 379 thereof).

In particular, FI, FII, FIII and FIV are $PDE_{cAMP}$ inhibitors. FI is a I:PDEI, FII is a I:PDEII, FIII is a I:PDEIII and FIV is a I:PDEIV.

The data for these compounds are presented above in the previous Example sections – for example see Table I.

As is evident, these $PDE_{cAMP}$ inhibitors enhance VIP-induced relaxations of isolated tissue.

FII – which is a selective I:PDEII - enhances VIP-induced increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FII also enhances pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI are selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11.

The data presented above in the previous Example sections are for FVI. However, similar results were obtained for FV.

As is evident, FV and FVI enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI also enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI also enhance VIP-induced and nerve-mediated relaxations of isolated tissue at clinically relevant doses.

## Conclusions

We have developed an animal model that mimics the physiological arousal response observed during female sexual arousal and directly reflects the clinical data obtained in human volunteers. The model uses Laser Doppler technologies to record small changes in vaginal blood flow induced by pelvic nerve stimulation or vasoactive transmitters. During sexual arousal, there is an increase in vaginal blood flow resulting from increased innervation from the pelvic nerve. The pelvic nerve-stimulated increase in vaginal blood flow, observed in the animal model, represents the endogenous vascular effects observed during female sexual arousal. Therefore this model can be used to firstly, identify the mechanisms involved in the regulation of vaginal blood flow and secondly, use the model to validate novel approaches for the enhancement of vaginal blood flow.

This study has successfully used a combination of *in vivo*, *in vitro* and biochemical techniques to identify cAMP as the mediator/second messenger regulating vaginal vasorelaxation (and vaginal wall relaxation). Using this animal model we have demonstrated that VIP-mediated increases in vaginal blood flow result from elevation of tissue cAMP, whereas previously VIP had been shown to increase vaginal blood flow in healthy volunteers but the cellular mechanism was not identified. Additionally, we have demonstrated that vaginal blood flow can be enhanced directly with a cAMPmimetic or indirectly by elevating cAMP concentrations.

The major cause of FSAD is decreased genital blood flow and this manifests itself as reduced vaginal, labial and clitoral engorgement. Treatment of women with FSAD is achievable by restoration of the *normal* sexual arousal response. This can be achieved by enhancing genital blood flow. Our approach for the treatment of FSAD will be to enhance vaginal blood flow/lubrication by either directly or indirectly potentiating endogenous cAMP signalling eg with an inhibitor of NEP (EC 3.4.24.11) or cAMP-hydrolysing PDE inhibitors. This will have the overall effect of restoring or mimicking the *normal* arousal response with no cardiovascular side effects. Sexual arousal/engorgement will be enhanced, rather than simply being induced in the absence of sexual drive, which may be the case with some exogenously administered vasoactive agents eg VIP.

All publications mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described methods and system of the present invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the present invention. Although the present invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in biochemistry and biotechnology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

## GENERAL TEXT REFERENCES

Ashur-Fabian, O., Perl ,O., Lilling, G., *et al.* (1999). SNV, a lipophilic superactive VIP analog, acts through cGMP to promote neuronal survival. *Peptides*, **20**, 629-633.

Berman, J.R., Berman, L. & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: Incidence, pathophysiology, evaluation, and treatment options. *Urology*, **54**, 385-391.

Berman, J., Goldstein, I., Werbin, T. *et al.* (1999a). Double blind placebo controlled study with crossover to assess effect of sildenafil on physiological parameters of the female sexual response. *J. Urol.*, **161**, 805.

*Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV*, American Psychiatric Association: Washington, DC., 1987, pp 493-518.

Fan, Y.P., Chakder, S. & Ratton, S. (1998). Inhibitory effect of zinc protoporphyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal polypeptide and other receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 468-474.

Foda, H.D., Sharaf, H.H., Absood, A. *et al.* (1995). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides*, **16**, 1057-1061.

Frank, E., Anderson, C. & Rubinstein, D. (1978). Frequency of sexual dysfunction in "normal" couples. *N. Engl. J. Med.*, **229**, 111-115.

Goldstein, I. & Berman, J.R. (1998). Vasculogenic female sexual dysfunction: vaginal engorgement and clitoral erectile insufficiency syndromes. *Int. J. Impot. Res.*, **10**, S84-S90.

Gu, Z.F., Jensen, R.T. & Maton, P.N. (1992). A primary role for protein kinase A in smooth muscle relaxation induced by adrenergic agonists and neuropeptides. *Am. J. Physiol.*, **263**, G360-G364.

Hoyle, C.H.V., Stones, R.W., Robson, T. *et al.* (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide containing nerves. *J. Anat.*, **188**, 633-644.

Ingenhoven, N. & Beck-Sickinger, A.G. (1997). Flourescent labelled analogues of neuropeptide Y for the characterisation of cells expressing NPY receptor subtypes. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **17**, 407-418.

Jovanovic, A., Jovanovic, S., Tulic,. I. *et al.* (1998). Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Human Reprod.*, **4**, 71-76.

Kaplan, H.S. (1974). The New Sex Therapy. London, Bailliere Tindall.

Kaplan, S.A., Reis, R.B., Kohm, I.J. *et al.* (1999). Safety and efficacy of sildenafil in postmenopausal women with sexual dysfunction. *Urology*, **53**, 481-486.

Kim, Y.C., Choi, H.K., Ahn, Y.S., *et al.* (1994). The effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on rabbit cavernosal smooth muscle contractility. *J. Androl.*, **15**, 392-739.

Laan, E. & Everaerd, W. (1998). Physiological measures of vaginal vasocongestion. *Int. J. Impot. Res.*, **10**, S107-S110.

Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, **10**, S104-S106.

Levin, R.J. (1980). The physiology of sexual function in women. *Clin. Obstet. Gynecol.*, **7**, 213-252.

Levin, R.J. (1991). VIP, vagina, clitoral and preurethral glans: An update on female genital arousal. *Exp. Clin. Endocrinol.*, **98**, 61-69.

Levin, R.J. (1992). The mechanisms of human female sexual arousal. *Ann. Rev. Sex Res.*, **3**, 1-48.

Levin, R.J. & Wagner, G. (1986). TRH and vaginal blood flow-effects in concious women and anaesthetised sheep. *J. Physiol.*, **373**, 83P.

292

Lundberg, J.M., Modin, A. & Malmstrom, R.E. (1996). Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 17, 301-304.

Masters, W.H., Johnson, V.E. *Human Sexual Response*. Little, Brown: Boston, 1996.

Ottesen, B., Gerstenberg, T., Ulrichsen, H. *et al.* (1983). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases vaginal blood flow and inhibits smooth muscle activity in women. *Eur. J. Clin. Invest.*, 13, 321-324.

Ottesen, B., Wagner, G. & Fahrenkrug, J. *Peptide innervation of the sexual organs.* In: Handbook of Sexology, Vol. 6, The Pharmacological and Endocrinology of Sexual Function, Sitsen, J.M.A. (eds), Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1988), chapter 4, pp 66-97.

Ottensen, B., Pedersen, B., Nielsen, J. *et al.* (1987). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides*, 8, 797-800.

Park, K., Goldstein, I., Andry, C., *et al.* (1997). Vasculogenic female sexual dysfunction: The hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. *Int. J. Impotence Res.*, 9, 27-37.

Rosen, R., Taylor, J., Leiblum, S. *et al.* (1993). Prevalence of sexual dysfunction in women: results of a survey of 329 women in an outpatient gynecological clinic. *J. Sex Marital Ther.*, 19, 171-188.

Schiavi, R.C. & Seagraves, R.T. (1995). The biology of sexual function. *Psychiat. Clin. North. Am.*, 18, 7-23.

Schoeffter, P. & Stoclet, J.C. (1985). Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 109, 275-279.

Serradeil-Le Gal, C., Valette, G., Rouby, P.E. *et al.* (1995). SR 120819A, an orally-active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Letters*, 3, 192-196.

Sjoberg, I. (1992). The vagina: Morphological, functional and ecological aspects. *Acta Obst. Gynecol. Scand.*, **71**, 84-85.

Spector, I.P. & Carey, M.P. (1990). Incidence and prevalence of sexual dysfunctions: a critical review of the empirical literature. *Arch. Sex. Behav.*, **19**, 389-408.

Wagner, G. (1992). Aspects of genital physiology and pathology. *Sem. Neurol.*, **12**, 87-97.

Werbin, T., Salimpour, P., Berman, L., et al. (1999). Effect of sexual stimulation and age on genital blood flow in women with sexual stimulation. *J. Urol.*, **161**, 688

Wincze, J.P., Albert, A. & Bansal, S. (1993). Sexual arousal in diabetic females: Physiological and self-report measures. *Arch. Sex Behav.*, **22**, 587-601.

Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M. *et al.* (1995). Subtype selectivity and antagonist profile of the nonpeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J Pharmacol Exp Ther.*, **275**, 143-9.

## REFERENCES FOR THE PDE SECTION

Han, P.; Fletcher, C. F.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Yaremko, L. M.; Michaeli, T. : Assignment of the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3 and of the human PDE7A gene to chromosome 8q13. Genomics 48: 275-276, 1998.

2. Michaeli, T.; Bloom, T. J.; Martins, T.; Loughney, K.; Ferguson, K.; Riggs, M.; Rodgers, L.; Beavo, J. A.; Wigler, M. : Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 268: 12925-12932, 1993.

3. Milatovich, A.; Bolger, G.; Michaeli, T.; Francke, U. : Chromosome localizations of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse. Somat. Cell Molec. Genet. 20: 75-86, 1994.

4. Rosman, G. J.; Martins, T. J.; Sonnenburg, W. K.; Beavo, J. A.; Ferguson, K.; Loughney, K. : Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3-prime,5-prime-cyclic nucleotide phosphodiesterase. Gene 191: 89-95, 1997.

## REFERENCES FOR THE NEP SECTION

1. Barker, P. E.; Shipp, M. A.; D'Adamio, L.; Masteller, E. L; Reinherz, E. L The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3(q21-q27). J. Immun. 142: 283-287, 1989.

2. D'Adamio, L.; Shipp, M. A.; Masteller, E. L; Reinherz, E. L. : Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5-prime untranslated regions. Proc. Nat. Acad. Sci. 86: 7103-7107, 1989.

3. Letarte, M.; Vera, S.; Tran, R.; Addis, J. B. L; Onizuka, R. J.; Quackenbush, E. J.; Jongeneel, C. V.; McInnes, R. R. : Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. J. Exp. Med. 168: 1247-1253, 1988.

4. Shipp, M. A.; Vijayaraghavan, J.; Schmidt, E. V.; Masteller, E. L; D'Adamio, L; Hersh, L. B.; Reinherz, E. L : Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ('enkephalinase'): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. 86: 297-301, 1989.

5. Tran-Paterson, R.; Willard, H. F.; Letarte, M. : The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase--3.4.24.11) gene is located on human chromosome 3. Cancer Genet. Cytogenet. 42: 129-134, 1989.

294

## REFERENCES FOR THE NPY SECTION

1. Allen, J. M.; Bloom, S. R. : Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8: 1-8, 1986.

2. Bahary, N.; Zorich, G.; Pachter, J. E.; Leibel, R. L.; Friedman, J. M. : Molecular genetic linkage maps of mouse chromosomes 4 and 6. Genomics 11: 33-47, 1991.

3. Baker, E.; Hort, Y. J.; Ball, H.; Sutherland, G. R.; Shine, J.; Herzog, H. : Assignment of the human neuropeptide Y gene to chromosome 7p15.1 by nonisotopic in situ hybridization. Genomics 26: 163-164, 1995.

5. Carr, L. G.; Foroud, T.; Bice, P.; Gobbett, T.; Ivashina, J.; Edenberg, H.; Lumeng, L.; Li, T. K. : A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. Alcohol Clin. Exp. Res. 22: 884-887, 1998.

5. Dockray, G. J. : Neuropeptide Y: in search of a function. Neurochem. Int. 8: 9-11, 1986.

6. Erickson, J. C.; Clegg, K. E.; Palmiter, R. D. : Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. Nature 381: 415-421, 1996. PubMed ID : 8632796

7. Erickson, J. C.; Hollopeter, G.; Palmiter, R. D. : Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274: 1704-1706, 1996.

8. Karvonen, M. K.; Pesonen, U.; Koulu, M.; Niskanen, L.; Laakso, M.; Rissanen, A.; Dekker, J. M.; 't Hart, L. M.; Valve, R.; Uusitupa, M. I. : Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. Nature Med. 4: 1434-1437, 1998.

9. Maccarrone, C.; Jarrott, B. : Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8: 13-22, 1986.

10. Meisler, M. H.; Spence, J. E.; Dixon, J. E.; Caldwell, R. M.; Minth, C. D.; Beaudet, A. L. : Exclusion of close linkage between the loci for cystic fibrosis and neuropeptide Y on human chromosome 7. Cytogenet. Cell Genet. 44: 175-176, 1987.

11. Minth, C. D.; Andrews, P. C.; Dixon, J. E. : Characterization, sequence, and expression of the cloned human neuropeptide Y gene. J. Biol. Chem. 261: 11974-11979, 1986.

12. Minth, C. D.; Bloom, S. R.; Polak, J. M.; Dixon, J. E. : Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 4577-4581, 1984.

13. Takeuchi, T.; Gumucio, D.; Eddy, R.; Meisler, M.; Minth, C.; Dixon, J.; Yamada, T.; Shows, T. : Assignment of the related pancreatic polypeptide (PPY) and neuropeptide Y (NPY) genes to regions on human chromosomes 17 and 7. (Abstract) Cytogenet. Cell Genet. 40: 759 only, 1985.

14. Takeuchi, T.; Gumucio, D. L.; Yamada, T.; Meisler, M. H.; Minth, C. D.; Dixon, J. E.; Eddy, R. E.; Shows, T. B. : Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. J. Clin. Invest. 77: 1038-1041, 1986.

15. Terenghi, G.; Polak, J. M.; Hamid, Q.; O'Brien, E.; Denny, P.; Legon, S.; Dixon, J.; Minth, C. D.; Palay, S. L.; Yasargil, G.; Chan-Palay, V. : Localization of neuropeptide Y mRNA in neurons of human cerebral cortex by means of in situ hybridization with a complementary RNA probe. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 7315-7318, 1987.

16. Thiele, T. E.; Marsh, D. J.; Ste. Marie, L.; Bernstein, I. L.; Palmiter, R. D. : Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. Nature 396: 366-369, 1998. .

17. Uusitupa, M. I. J.; Karvonen, M. K.; Pesonen, U.; Koulu, M. : Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism. Ann. Med. 30: 508-510, 1998.

295

## REFERENCES FOR THE NPYR1 SECTION

1. Herzog, H.; Baumgartner, M.; Vivero, C.; Selbie, L. A.; Auer, B.; Shine, J. : Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor. J. Biol. Chem. 268: 6703-6707, 1993.

2. Herzog, H.; Darby, K.; Ball, H.; Hort, Y.; Beck-Sickinger, A.; Shine, J. : Overlapping gene structure of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests coordinate transcriptional regulation. Genomics 41: 315-319, 1997.

3. Herzog, H.; Hort, Y. J.; Ball, H. J.; Hayes, G.; Shine, J.; Selbie, L. A. : Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. Proc. Nat. Acad. Sci. 89: 5794-5798, 1992.

4. Larhammar, D.; Blomqvist, A. G.; Yee, F.; Jazin, E.; Yoo, H.; Wahlestedt, C. : Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. J. Biol. Chem. 267: 10935-10938, 1992.

5. Lutz, C. M.; Frankel, W. N.; Richards, J. E.; Thompson, D. A. : Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

## REFERENCES FOR THE NPYR2 SECTION

1. Ammar, D. A.; Eadie, D. M.; Wong, D. J.; Ma, Y.-Y.; Kolakowski, L. F., Jr.; Yang-Feng, T. L.; Thompson, D. A. : Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide Y receptor gene. Genomics 38: 392-398, 1996.

2. Gerald, C.; Walker, M. W.; Vaysse, P. J.-J.; He, C.; Branchek, T. A.; Weinshank, R. L. : Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. J. Biol. Chem. 270: 26758-26761, 1995.

3. Lutz, C. M.; Frankel, W. N.; Richards, J. E.; Thompson, D. A. : Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

4. Rose, P. M.; Fernandes, P.; Lynch, J. S.; Frazier, S. T.; Fisher, S. M.; Kodukula, K.; Kienzle, B.; Seethala, R. : Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. J. Biol. Chem. 270: 22661-22664, 1995.

## REFERENCES FOR THE VIP SECTION

1. Bodner, M.; Fridkin, M.; Gozes, I. : Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3548-3551, 1985.

2. Gotoh, E.; Yamagami, T.; Yamamoto, H.; Okamoto, H. : Chromosomal assignment of human VIP/PHM-27 gene to 6q26-q27 region by spot blot hybridization and in situ hybridization. Biochem. Int. 17: 555-562, 1988.

3. Gozes, I.; Avidor, R.; Yahav, Y.; Katznelson, D.; Croce, C. M.; Huebner, K. : The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21-6qter. Hum. Genet. 75: 41-44, 1987.

4. Gozes, I.; Nakai, H.; Byers, M.; Avidor, R.; Weinstein, Y.; Shani, Y.; Shows, T. B. : Sequential expression in the nervous system of C-MYB and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24. Somat. Cell Molec. Genet. 13: 305-313, 1987.

5. Heinz-Erian, P.; Dey, R. D.; Flux, M.; Said, S. I. : Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. Science 229: 1407-1408, 1985.

6. Itoh, N.; Obata, K.; Yanaihara, N.; Okamoto, H. : Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature 304: 547-549, 1983.

7. Linder, S.; Barkhem, T.; Norberg, A.; Persson, H.; Schalling, M.; Hokfelt, T.; Magnusson, G. : Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 605-609, 1987.

8. Omary, M. B.; Kagnoff, M. F. : Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line. Science 238: 1578-1581, 1987.

## REFERENCES FOR THE AC SECTION

1. Parma, J.; Stengel, D.; Gannage, M.-H.; Poyard, M.; Barouki, R.; Hanoune, J. : Sequence of a human brain adenylyl cyclase partial cDNA: evidence for a consensus cyclase domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 455-462, 1991.

2. Stengel, D.; Parma, J.; Gannage, M.-H.; Roeckel, N.; Mattei, M.-G.; barouki, R.; Hanoune, J. : Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. Hum. Genet. 90: 126-130, 1992.

297 ~~297~~

## REFERENCES FOR THE VPAC1 SECTION

1. Couvineau, A.; Rouyer-Fessard, C.; Darmoul, D.; Maoret, J.-J.; Carrero, I.; Ogier-Denis, E.; Laburthe, M. : Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains. Biochem. Biophys. Res. Commun. 200: 769-776, 1994.

2. Hashimoto, H.; Nishino, A.; Shintani, N.; Hagihara, N.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Yamamoto, K.; Matsuda, T.; Ishihara, T.; Nagata, S.; Baba, A. : Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VPAC-1) receptor. Genomics 58: 90-93, 1999.

3. Libert, F.; Passage, E.; Parmentier, M.; Simons, M.-J.; Vassart, G.; Mattei, M.-G. : Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonin receptor. Genomics 11: 225-227, 1991.

4. Sreedharan, S. P.; Huang, J.-X.; Cheung, M.-C.; Goetzl, E. J. : Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. Proc. Nat. Acad. Sci. 92: 2939-2943, 1995.

5. Sreedharan, S. P.; Patel, D. R.; Huang, J.-X.; Goetzl, E. J. : Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193: 546-553, 1993.

6. Sreedharan, S. P.; Robichon, A.; Peterson, K. E.; Goetzl, E. J. : Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. 88: 4986-4990, 1991.

7. Vassart, G. : Personal Communication. Brussels, Belgium, 1/15/1992. 8. Wenger, G. D. : Personal Communication. Columbus, Ohio, 8/3/1993.

## REFERENCES FOR THE VPAC2 SECTION

1. Adamou, J. E.; Aiyar, N.; Van Horn, S.; Elshourbagy, N. A. : Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commmun. 209: 385-392, 1995.

2. Mackay, M.; Fantes, J.; Scherer, S.; Boyle, S.; West, K.; Tsui, L.-C.; Belloni, E.; Lutz, E.; Van Heyningen, V.; Harmar, A. J. : Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. Genomics 37: 345-353, 1996.

3. Svoboda, M.; Tastenoy, M.; Van Rampelbergh, J.; Goossens, J.-F.; De Neef, P.; Waelbroeck, M.; Robberecht, P. : Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochem. Biophy. Res. Commun. 205: 1617-1624, 1994.

## SEQUENCE LISTINGS

### 1. NEP (EC 3.4.24.11)

```
LOCUS       HSMRNAEN     3181 bp    mRNA            PRI       12-SEP-1993
DEFINITION  Human mRNA for enkephalinase (EC 3.4.24.11).
ACCESSION   X07166
NID         g34757
VERSION     X07166.1  GI:34757
KEYWORDS    enkephalinase; metalloprotein; neutral endopeptidase.
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
            Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 3181)
  AUTHORS   Malfroy,B., Kuang,W.J., Seeburg,P.H., Mason,A.J. and Schofield,P.R.
  TITLE     Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase
            (neutral endopeptidase)
  JOURNAL   FEBS Lett. 229 (1), 206-210 (1988)
  MEDLINE   88152222
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..3181
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /tissue_type="placenta"
                     /clone_lib="lambda gt10"
                     /clone="lambda H7"
     CDS             18..2249
                     /note="enkephalinase (AA 1-743)"
                     /codon_start=1
                     /protein_id="CAA30157.1"
                     /db_xref="PID:g34758"
                     /db_xref="GI:34758"
                     /db_xref="SWISS-PROT:P08473"
                     /translation="MDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYAT
                     YDDGICKSSDCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKYACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDI
                     LRDELEVVLKDVLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINESAIDSRGGEPLLKLLPDIYGW
                     PVATENWEQKYGASWTAEKAIAQLNSKYGKKVLINLFVGTDDKNSVNHVIHIDQPRLG
                     LPSRDYYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDENQLALEMNKVMELEKEI
                     ANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSLEINGKPFSWLNFTNEIMSTVNISITNE
                     EDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTYKESRNAFRKALY
                     GTTSETATWRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDD
                     LTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNKLNNEYLELNYKEDEYFENIIQNL
                     KFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSL
                     NYGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSASNFKEQSQCMVYQYGNFSW
                     DLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLGQAYRAYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQLFFLN
                     FAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEKKC
                     RVW"
     misc_feature    3073..3078
                     /note="poly A signal"
```

```
BASE COUNT     1055 a    582 c    657 g    887 t
ORIGIN
        1 gcaagtcaga aagtcagatg gatataactg atatcaacac tccaaagcca aagaagaaac
       61 agcgatggac tccactggag atcagcctct cggtccttgt cctgctcctc accatcatag
      121 ctgtgacaat gatcgcactc tatgcaacct acgatgatgg tatttgcaag tcatcagact
      181 gcataaaatc agctgctcga ctgatccaaa acatggatgc caccactgag ccttgtacag
      241 actttttcaa atatgcttgc ggaggctggt tgaaacgtaa tgtcattccc gagaccagct
      301 cccgttacgg caactttgac attttaagag atgaactaga agtcgttttg aaagatgtcc
      361 ttcaagaacc caaaactgaa gatatagtag cagtgcagaa agcaaaagca ttgtacaggt
      421 cttgtataaa tgaatctgct attgatagca gaggtggaga acctctactc aaactgttac
      481 cagacatata tgggtggcca gtagcaacag aaaactggga gcaaaaatat ggtgcttctt
      541 ggacagctga aaaagctatt gcacaactga attctaaata tgggaaaaaa gtccttatta
      601 atttgtttgt tggcactgat gataagaatt ctgtgaatca tgtaattcat attgaccaac
      661 ctcgacttgg cctccccttct agagattact atgaatgcac tggaatctat aaagaggctt
      721 gtacagcata tgtggatttt atgatttctg tggccagatt gattcgtcag gaagaaagat
      781 tgcccatcga tgaaaaccag cttgctttgg aaatgaataa agttatggaa ttggaaaaag
      841 aaattgccaa tgctacggct aaacctgaag atcgaaatga tccaatgctt ctgtataaca
      901 agatgacatt ggcccagatc caaaataact tttcactaga gatcaatggg aagccattca
      961 gctggttgaa tttcacaaat gaaatcatgt caactgtgaa tattagtatt acaaatgagg
     1021 aagatgtggt tgtttatgct ccagaatatt taaccaaact taagcccatt cttaccaaat
     1081 attctgccag agatcttcaa aatttaatgt cctggagatt cataatggat cttgtaagca
     1141 gcctcagccg aacctacaag gagtccagaa atgctttccg caaggccctt tatggtacaa
     1201 cctcagaaac agcaacttgg agacgttgtg caaactatgt caatgggaat atggaaaatg
     1261 ctgtggggag gctttatgtg gaagcagcat ttgctggaga gagtaaacat gtggtcgagg
     1321 atttgattgc acagatccga gaagttttta ttcagacttt agatgacctc acttggatgg
     1381 atgccgagac aaaaaagaga gctgaagaaa aggccttagc aattaaagaa aggatcggct
     1441 atcctgatga cattgtttca aatgataaca aactgaataa tgagtacctc gagttgaact
     1501 acaaagaaga tgaatacttc gagaacataa ttcaaaattt gaaattcagc caaagtaaac
     1561 aactgaagaa gctccgagaa aaggtggaca aagatgagtg gataagtgga gcagctgtag
     1621 tcaatgcatt ttactcttca ggaagaaatc agatagtctt cccagccggc attctgcagc
     1681 ccccttctt tagtgcccag cagtccaact cattgaacta tgggggcatc ggcatggtca
     1741 taggacacga aatcacccat ggcttcgatg acaatggcag aaactttaac aaagatggag
     1801 acctcgttga ctggtggact caacagtctg caagtaactt taaggagcaa tcccagtgca
     1861 tggtgtatca gtatggaaac ttttcctggg acctggcagg tggacagcac cttaatggaa
     1921 ttaatacact gggagaaaac attgctgata atggaggtct tggtcaagca tacagagcct
     1981 atcagaatta tattaaaaag aatggcgaag aaaaattact tcctggactt gacctaaatc
     2041 acaaacaact atttttcttg aactttgcac aggtgtggtg tggaacctat aggccagagt
     2101 atgcggttaa ctccattaaa acagatgtgc acagtccagg caatttcagg attattggga
     2161 ctttgcagaa ctctgcagag ttttcagaag cctttcactg ccgcaagaat tcatacatga
     2221 atccagaaaa gaagtgccgg gtttggtgat cttcaaaaga agcattgcag cccttggcta
     2281 gacttgccaa caccacagaa atggggaatt ctctaatcga aagaaaatgg gccctagggg
     2341 tcactgtact gacttgaggg tgattaacag agagggcacc atcacaatac agataacatt
     2401 aggttgtcct agaaagggtg tggagggagg aagggggtct aaggtctatc aagtcaatca
     2461 tttctcactg tgtacataat gcttaatttc taaagataat attactgttt atttctgttt
     2521 ctcatatggt ctaccagttt gctgatgtcc ctagaaaaca atgcaaaacc tttgaggtag
     2581 accaggattt ctaatcaaaa gggaaaagaa gatgttgaag aatacagtta ggcaccagaa
     2641 gaacagtagg tgacactata gtttaaaaca cattgcctaa ctactagttt ttacttttat
     2701 ttgcaacatt tacagtcctt caaaatcctt ccaaagaatt cttatacaca ttggggcctt
     2761 ggagcttaca tagttttaaa ctcattttg ccatacatca gttattcatt ctgtgatcat
     2821 ttattttaag cactcttaaa gcaaaaaatg aatgtctaaa attgtttttt gttgtacctg
     2881 ctttgactga tgctgagatt cttcaggctt cctgcaattt tctaagcaat ttcttgctct
```

2941 atctctcaaa acttggtatt tttcagagat ttatataaat gtaaaaataa taattttat
3001 atttaattat taactacatt tatgagtaac tattattata ggtaatcaat gaatattgaa
3061 gtttcagctt aaaataaaca gttgtgaacc aagatctata aagcgatata cagatgaaaa
3121 tttgagacta tttaaactta taaatcatat tgatgaaaag atttaagcac aaactttagg
3181 g

## 2. PDE type 1

```
LOCUS       HSPDE1A3A    2008 bp    mRNA            PRI       12-APR-1996
DEFINITION  Human 3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase (HSPDE1A3A) mRNA,
            complete cds.
ACCESSION   U40370
NID         g1151108
VERSION     U40370.1  GI:1151108
KEYWORDS    calmodulin-stimulated phosphodiesterase.
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2008)
  AUTHORS   Loughney,K., Martins,T.J., Harris,E.A., Sadhu,K., Hicks,J.B.,
            Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A. and Ferguson,K.
  TITLE     Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human
            calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide
            phosphodiesterases
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 271 (2), 796-806 (1996)
  MEDLINE   96132810
REFERENCE   2  (bases 1 to 2008)
  AUTHORS   Loughney,K., Martins,T.J., Harris,E.A.S., Sadhu,K., Hicks,J.B.,
            Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A. and Ferguson,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-NOV-1995) Kate Loughney, ICOS, 22021 20th Ave. S.E.,
            Bothell, WA 98021, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2008
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            85..1692
                     /gene="PDE1A"
     CDS             85..1692
                     /gene="PDE1A"
                     /note="PDE1A3; type I phosphodiesterase"
                     /codon_start=1
                     /product="3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase"
                     /protein_id="AAC50436.1"
                     /db_xref="PID:g1151109"
                     /db_xref="GI:1151109"
                     /translation="MGSSATEIEELENTTFKYLTGEQTEKMWQRLKGILRCLVKQLER
                     GDVNVVDLKKNIEYAASVLEAVYIDETRRLLDTEDELSDIQTDSVPSEVRDWLASTFT
                     RKMGMTKKKPEEKPKFRSIVHAVQAGIFVERMYRKTYHMVGLAYPAAVIVTLKDVDKW
                     SFDVFALNEASGEHSLKFMIYELFTRYDLINRFKIPVSCLITFAEALEVGYSKYKNPY
                     HNLIHAADVTQTVHYIMLHTGIMHWLTELEILAMVFAAAIHDYEHTGTTNNFHIQTRS
                     DVAILYNDRSVLENHHVSAAYRLMQEEEMNILINLSKDDWRDLRNLVIEMVLSTDMSG
                     HFQQIKNIRNSLQQPEGIDRAKTMSLILHAADISHPAKSWKLHYRWTMALMEEFFLQG
                     DKEAELGLPFSPLCDRKSTMVAQSQIGFIDFIVEPTFSLLTDSTEKIVIPLIEEASKA
                     ETSSYVASSSTTIVGLHIADALRRSNTKGSMSDGSYSPDYSLAAVDLKSFKNNLVDII
                     QQNKERWKELAAQEARTSSQKCEFIHQ"
```

300

```
BASE COUNT      627 a    400 c    437 g    544 t
ORIGIN
        1 gaattctgat gtgcttcagt gcacagaaca gtaacagatg agctgctttt ggggagagct
       61 tgagtactca gtcggagcat catcatgggg tctagtgcca cagagattga agaattggaa
      121 aacaccactt ttaagtatct tacaggagaa cagactgaaa aaatgtggca gcgcctgaaa
      181 ggaatactaa gatgcttggt gaagcagctg gaaagaggtg atgttaacgt cgtcgactta
      241 aagaagaata ttgaatatgc ggcatctgtg ctggaagcag tttatatcga tgaaacaaga
      301 agacttctgg atactgaaga tgagctcagt gacattcaga ctgactcagt cccatctgaa
      361 gtccgggact ggttggcttc taccttttaca cggaaaatgg ggatgacaaa aaagaaacct
      421 gaggaaaaac caaaatttcg gagcattgtg catgctgttc aagctggaat tttgtggaa
      481 agaatgtacc gaaaaacata tcatatggtt ggtttggcat atccagcagc tgtcatcgta
      541 acattaaagg atgttgataa atggtctttc gatgtatttg ccctaaatga agcaagtgga
      601 gagcatagtc tgaagtttat gatttatgaa ctgtttacca gatatgatct tatcaaccgt
      661 ttcaagattc ctgtttcttg cctaatcacc tttgcagaag ctttagaagt tggttacagc
      721 aagtacaaaa atccatatca caatttgatt catgcagctg atgtcactca aactgtgcat
      781 tacataatgc ttcatacagg tatcatgcac tggctcactg aactggaaat tttagcaatg
      841 gtctttgctg ctgccattca tgattatgag catacaggga caacaaacaa ctttcacatt
      901 cagacaaggt cagatgttgc cattttgtat aatgatcgct ctgtccttga gaatcaccac
      961 gtgagtgcag cttatcgact tatgcaagaa gaagaaatga atatcttgat aaatttatcc
     1021 aaagatgact ggagggatct tcggaaccta gtgattgaaa tggttttatc tacagacatg
     1081 tcaggtcact tccagcaaat taaaaatata agaaacagtt tgcagcagcc tgaagggatt
     1141 gacagagcca aaaccatgtc cctgattctc cacgcagcag acatcagcca cccagccaaa
     1201 tcctggaagc tgcattatcg gtggaccatg gccctaatgg aggagttttt cctgcaggga
     1261 gataaagaag ctgaattagg gcttccattt tccccacttt gtgatcggaa gtcaaccatg
     1321 gtggcccagt cacaaatagg tttcatcgat ttcatagtag agccaacatt ttctcttctg
     1381 acagactcaa cagagaaaat tgttattcct cttatagagg aagcctcaaa agccgaaact
     1441 tcttcctatg tggcaagcag ctcaaccacc attgtggggt tacacattgc tgatgcacta
     1501 agacgatcaa atacaaaagg ctccatgagt gatgggtcct attccccaga ctactccctt
     1561 gcagcagtgg acctgaagag tttcaagaac aacctggtgg acatcattca gcagaacaaa
     1621 gagaggtgga aagagttagc tgcacaagaa gcaagaacca gttcacagaa gtgtgagttt
     1681 attcatcagt aaacaccttt aagtaaaacc tcgtgcatgg tggcagctct aatttgacca
     1741 aaagacttgg agattttgat tatgcttgct ggaaatctac cctgtcctgt gtgagacagg
     1801 aaatctattt ttgcagattg ctcaataagc atcatgagcc acataaataa cagctgtaaa
     1861 ctccttaatt caccgggctc aactgctacc gaacagattc atctagtggc tacatcagca
     1921 ccttgtgctt tcagatatct gtttcaatgg cattttgtgg catttgtctt taccgagtgc
     1981 caataaattt tctttgagca aaaaaaaa
//
```

## 3. PDE type 2

```
LOCUS       HSU67733     4240 bp    mRNA            PRI       21-MAY-1997
DEFINITION  Human cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase
            PDE2A3 (PDE2A) mRNA, complete cds.
ACCESSION   U67733
NID         g2108051
VERSION     U67733.1  GI:2108051
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 4240)
  AUTHORS   Rosman,G.J., Martins,T.J., Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A., Ferguson,K.
            and Loughney,K.
  TITLE     Isolation and characterization of human cDNAs encoding a
            cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase
  JOURNAL   Gene 191 (1), 89-95 (1997)
  MEDLINE   97354299
REFERENCE   2  (bases 1 to 4240)
  AUTHORS   Rosman,G.J., Martins,T.J., Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A., Ferguson,K.
            and Loughney,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (21-AUG-1996) Icos Corporation, 22021 20th Ave. S.E.,
            Bothell, WA 98021, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..4240
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            162..2987
                     /gene="PDE2A"
     CDS             162..2987
                     /gene="PDE2A"
                     /function="cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide
                     phosphodiesterase"
                     /note="PDE2 family; splice variant 3"
                     /codon_start=1
                     /product="PDE2A3"
                     /protein_id="AAC51320.1"
                     /db_xref="PID:g2108052"
                     /db_xref="GI:2108052"
                     /translation="MGQACGHSILCRSQQYPAARPAEPRGQQVFLKPDEPPPPPQPCA
                     DSLQDALLSLGSVIDISGLQRAVKEALSAVLPRVETVYTYLLDGESQLVCEDPPHELP
                     QEGKVREAIISQKRLGCNGLGFSDLPGKPLARLVAPLAPDTQVLVMPLADKEAGAVAA
                     VILVHCGQLSDNEEWSLQAVEKHTLVALRRVQVLQQRGPREAPRAVQNPPEGTAEDQK
                     GGAAYTDRDRKILQLCGELYDLDASSLQLKVLQYLQQETRASRCCLLLVSEDNLQLSC
                     KVIGDKVLGEEVSFPLTGCLGQVVEDKKSIQLKDLTSEDVQQLQSMLGCELQAMLCVP
                     VISRATDQVVALACAFNKLEGDLFTDEDEHVIQHCFHYTSTVLTSTLAFQKEQKLKCE
```

301

```
                    CQALLQVAKNLFTHLDDVSVLLQEIITEARNLSNAEICSVFLLDQNELVAKVFDGGVV
                    DDESYEIRIPADQGIAGHVATTGQILNIPDAYAHPLFYRGVDDSTGFRTRNILCFPIK
                    NENQEVIGVAELVNKINGPWFSKFDEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHL
                    ANEMMMYHMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQ
                    DMNFINNYKIDCPTLARFCLMVKKGYRDPPYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLE
                    DIEIFALFISCMCHDLDHRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSVMERHHFAQAIAILNT
                    HGCNIFDHFSRKDYQRMLDLMRDIILATDLAHHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHHRL
                    LLCLLMTSCDLSDQTKGWKTTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIP
                    ELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNREHWTKVSHKFTIRGLPSNNSLD
                    FLDEEYEVPDLDGTRAPINGCCSLDAE*
BASE COUNT      902 a   1260 c   1202 g    876 t
ORIGIN
        1 cagcagagct ggattggggt gttgagtcca ggctgagtag gggcagccc actgctcttg
       61 gtccctgtgc ctgctggggg tgccctgccc tgaactccag gcagcgggga cagggcgagg
      121 tgccacctta gtctggctgg ggaggcggac gatgaggagt gatggggcag gcatgcggcc
      181 actccatcct ctgcaggagc cagcagtacc cggcagcgcg accggctgag ccgcggggcc
      241 agcaggtctt cctcaagccg gacgagccgc cgccgccgcc gcagccatgc gccgacagcc
      301 tgcaggacgc cttgctgagt ctgggctctg tcatcgacat ttcaggcctg caacgtgctg
      361 tcaaggaggc cctgtcagct gtgctccccc gagtggaaac tgtctacacc tacctactgg
      421 atggtgagtc ccagctggtg tgtgaggacc ccccacatga gctgccccag gaggggaaag
      481 tccgggaggc tatcatctcc cagaagcggc tgggctgcaa tgggctgggc ttctcagacc
      541 tgccagggaa gcccttggcc aggctggtgg ctccactggc tcctgatacc caagtgctgg
      601 tcatgccgct agcggacaag gaggctgggg ccgtggcagc tgtcatcttg gtgcactgtg
      661 gccagctgag tgataatgag gaatggagcc tgcaggcggt ggagaagcat accctggtcg
      721 ccctgcggag ggtgcaggtc ctgcagcagc gcgggcccag ggaggctccc cgagccgtcc
      781 agaacccccc ggaggggacg gcggaagacc agaagggcgg ggcggcgtac accgaccgcg
      841 accgcaagat cctccaactg tgcggggaac tctacgacct ggatgcctct tccctgcagc
      901 tcaaagtgct ccaatacctg cagcaggaga cccgggcatc ccgctgctgc ctcctgctgg
      961 tgtcggagga caatctccag ctttcttgca aggtcatcgg agacaaagtg ctcggggaag
     1021 aggtcagctt tcccttgaca ggatgcctgg gccaggtggt ggaagacaag aagtccatcc
     1081 agctgaagga cctcacctcc gaggatgtac aacagctgca gagcatgttg ggctgtgagc
     1141 tgcaggccat gctctgtgtc cctgtcatca gccgggccac tgaccaggtg gtggccttgg
     1201 cctgcgcctt caacaagcta gaaggagact tgttcaccga cgaggacgag catgtgatcc
     1261 agcactgctt ccactacacc agcaccgtgc tcaccagcac cctggccttc cagaaggaac
     1321 agaaactcaa gtgtgagtgc caggctcttc tccaagtggc aaagaacctc ttcacccacc
     1381 tggatgacgt ctctgtcctg ctccaggaga tcatcacgga ggccagaaac ctcagcaacg
     1441 cagagatctg ctctgtgttc ctgctggatc agaatgagct ggtggccaag gtgttcgacg
     1501 gggggcgtggt ggatgatgag agctatgaga tccgcatccc ggccgatcag ggcatcgcgg
     1561 gacacgtggc gaccacgggc cagatcctga acatccctga cgcatatgcc catccgcttt
     1621 tctaccgcgg cgtggacgac agcaccggct tccgcacgcg caacatcctc tgcttcccca
     1681 tcaagaacga gaaccaggag gtcatcggtg tggccgagct ggtgaacaag atcaatgggc
     1741 catggttcag caagttcgac gaggacctgg cgacggcctt ctccatctac tgcggcatca
     1801 gcatcgccca ttctctccta tacaaaaaag tgaatgaggc tcagtatcgc agccacctgg
     1861 ccaatgagat gatgatgtac cacatgaagg tctccgacga tgagtatacc aaacttctcc
     1921 atgatgggat ccagcctgtg gctgccattg actccaattt tgcaagtttc acctataccc
     1981 ctcgttccct gcccgaggat gacacgtcca tggccatcct gagcatgctg caggacatga
     2041 atttcatcaa caactacaaa attgactgcc cgaccctggc ccggttctgt ttgatggtga
     2101 agaagggcta ccgggatccc ccctaccaca actggatgca cgccttttct gtctcccact
     2161 tctgctacct gctctacaag aacctggagc tcaccaacta cctcgaggac atcgagatct
     2221 ttgccttgtt tatttcctgc atgtgtcatg acctggacca cagaggcaca aacaactctt
     2281 tccaggtggc ctcgaaatct gtgctggctg cgctctacag ctctgagggc tccgtcatgg
```

```
2341 agaggcacca ctttgctcag gccatcgcca tcctcaacac ccacggctgc aacatctttg
2401 atcatttctc ccggaaggac tatcagcgca tgctggatct gatgcgggac atcatcttgg
2461 ccacagacct ggcccaccat ctccgcatct tcaaggacct ccagaagatg gctgaggtgg
2521 gctacgaccg aaacaacaag cagcaccaca gacttctcct ctgcctcctc atgacctcct
2581 gtgacctctc tgaccagacc aagggctgga agactacgag aaagatcgcg gagctgatct
2641 acaaagaatt cttctcccag ggagacctgg agaaggccat gggcaacagg ccgatggaga
2701 tgatggaccg ggagaaggcc tatatccctg agctgcaaat cagcttcatg gagcacattg
2761 caatgcccat ctacaagctg ttgcaggacc tgttccccaa agcggcagag ctgtacgagc
2821 gcgtggcctc caaccgtgag cactggacca aggtgtccca caagttcacc atccgcggcc
2881 tcccaagtaa caactcgctg gacttcctgg atgaggagta cgaggtgcct gatctggatg
2941 gcactagggc ccccatcaat ggctgctgca gccttgatgc tgagtgatcc cctccaggac
3001 acttccctgc ccaggccacc tcccacagcc ctccactggt ctggccagat gcactgggaa
3061 cagagccacg ggtcctgggt cctagaccag gacttcctgt gtgaccctgg acaagtacta
3121 ccttcctggg cctcagcttt ctcgtctgta taatggaagc aagacttcca acctcacgga
3181 gactttgtaa tttgcttctc tgagagcaca ggggtgacca atgagcagtg ggccctactc
3241 tgcacctctg accacacctt ggcaagtctt tcccaagcca ttctttgtct gagcagcttg
3301 atggtttctc cttgccccat ttctgcccca ccagatcttt gctcctttcc ctttgaggac
3361 tcccaccctt tgggtctcca ggatcctcat ggaaggggaa ggtgagacat ctgagtgagc
3421 agagtgtggc atcttggaaa cagtccttag ttctgtggga ggactagaaa cagccgcggc
3481 gaaggccccc tgaggaccac tactatactg atggtgggat tgggacctgg gggatacagg
3541 ggccccagga agaagctggc cagaggggca gctcagtgct ctgcagagag gggccctggg
3601 gagaagcagg atgggattga tgggcaggag ggatccccgc actgggagac aggcccaggt
3661 atgaatgagc cagccatgct tcctcctgcc tgtgtgacgc tgggcgagtc tcttcccctg
3721 tctgggccaa acagggagcg ggtaagacaa tccatgctct aagatccatt ttagatcaat
3781 gtctaaaata gctctatggc tctgcggagt cccagcagag gctatggaat gtttctgcaa
3841 ccctaaggca cagagagcca accctgagtg tctcagaggc cccctgagtg ttccccttgg
3901 cctgagcccc ttacccattc ctgcagccag tgagagacct ggcctcagcc tggcagcgct
3961 ctcttcaagg ccatatccac ctgtgccctg gggcttggga gaccccatag gccgggactc
4021 ttgggtcagc ccgccactgg cttctctctt tttctccgtt tcattctgtg tgcgttgtgg
4081 ggtgggggag gggtccacc tgccttacct ttctgagttg cctttagaga gatgcgtttt
4141 tctaggactc tgtgcaactg tcgtatatgg tcccgtgggc tgaccgcttt gtacatgaga
4201 ataaatctat ttctttctac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

## 4. NPY

```
LOCUS       HUMNPY         551 bp    mRNA             PRI       07-JAN-1995
DEFINITION  Human neuropeptide Y (NPY) mRNA, complete cds.
ACCESSION   K01911
NID         g189273
VERSION     K01911.1  GI:189273
KEYWORDS    neuropeptide Y.
SOURCE      Human phaeochromocytoma, cDNA to mRNA, clone pNPY3-75.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 551)
  AUTHORS   Minth,C.D., Bloom,S.R., Polak,J.M. and Dixon,J.E.
  TITLE     Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA
            encoding neuropeptide tyrosine
  JOURNAL   Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 (14), 4577-4581 (1984)
  MEDLINE   84272678
COMMENT     Neuropeptide Y (NPY) is one of the most abundant peptides in the
            mammalian nervous system, and its extensive distribution suggests a
            neuro-transmitter or -modulator role. NPY is also found in some
            chromaffin cells of the adrenal medulla.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..551
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /tissue_type="phaeochromocytoma"
                     /map="7pter-q22"
     mRNA            <1..551
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
     gene            1..551
                     /gene="NPY"
     sig_peptide     87..170
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
     CDS             87..380
                     /gene="NPY"
                     /codon_start=1
                     /db_xref="GDB:G00-119-456"
                     /product="neuropeptide Y"
                     /protein_id="AAA59944.1"
                     /db_xref="PID:g189274"
                     /db_xref="GI:189274"
                     /translation="MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAED
                     MARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRLEDPAMW"
     mat_peptide     171..278
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
                     /product="neuropeptide Y"
BASE COUNT      131 a    171 c    129 g    120 t
ORIGIN      51 bp upstream of RsaI site.
        1 accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc
       61 ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgactgggg ctgtccggac
      121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgaggcg taccccctcca
      181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
      241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
      301 cactgatttc agacctcttg atgagagaaa gcacagaaaa tgttcccaga actcggcttg
      361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
      421 gcccatattt catcgtgtaa aacgagaatc cacccatcct accaatgcat gcagccactg
      481 tgctgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
      541 atcatgcatt c
```

## 6. NPY Y1 Receptor

```
LOCUS       A26481       2624 bp    mRNA            PAT       17-OCT-1995
DEFINITION  Human NPY receptor Y1 gene cDNA.
ACCESSION   A26481
NID         g1247452
VERSION     A26481.1  GI:1247452
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
            Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2624)
  AUTHORS   .
  TITLE     HUMAN NEUROPEPTIDE Y-Y1 RECEPTOR
  JOURNAL   Patent: WO 9309227-A 3 13-MAY-1993;
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2624
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     CDS             152..1306
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y Y1 receptor"
                     /protein_id="CAA01819.1"
                     /db_xref="PID:e205126"
                     /db_xref="PID:g1247453"
                     /db_xref="GI:1247453"
                     /db_xref="SWISS-PROT:P25929"
                     /translation="MNSTLFSQVENHSVHSNFSEKNAQLLAFENDDCHLPLAMIFTLA
                     LAYGAVIILGVSGNLALIIIILKQKEMRNVTNILIVNLSFSDLLVAIMCLPFTFVYTL
                     MDHWVFGEAMCKLNPFVQCVSITVSIFSLVLIAVERHQLIINPRGWRPNNRHAYVGIA
                     VIWVLAVASSLPFLIYQVMTDEPFQNVTLDAYKDKYVCFDQFPSDSHRLSYTTLLLVL
                     QYFGPLCFIFICYFKIYIRLKRRNNMMDKMRDNKYRSSETKRINIMLLSIVVAFAVCW
                     LPLTIFNTVFDWNHQIIATCNHNLLFLLCHLTAMISTCVNPIFYGFLNKNFQRDLQFF
                     FNFCDFRSRDDDYETIAMSTMHTDVSKTSLKQASPVAFKKINNNDDNEKI"
BASE COUNT      791 a    479 c    473 g    878 t       3 others
ORIGIN
        1 attgttcagt tcaagggaat gaagaattca gaataatttt ggtaaatgga ttccaatatc
       61 gggaataaga ataagctgaa cagttgacct gctttgaaga aacatactgt ccatttgtct
      121 aaaataatct ataacaacca aaccaatcaa aatgaattca acattatttt cccaggttga
      181 aaatcattca gtccactcta atttctcaga gaagaatgcc cagcttctgg cttttgaaaa
      241 tgatgattgt catctgcccт tggccatgat atttacctta gctcttgctt atggagctgt
      301 gatcattctt ggtgtctctg gaaacctggc cttgatcata atcatcttga aacaaaagga
      361 gatgagaaat gttaccaaca tcctgattgt gaacctttcc ttctcagact tgcttgttgc
      421 catcatgtgt ctcccctttа catttgtcta cacattaatg gaccactggg tctttggtga
      481 ggcgatgtgt aagttgaatc cttttgtgca atgtgtttca atcactgtgt ccattttctc
      541 tctggttctc attgctgtgg aacgacatca gctgataatc aaccctcgag ggtggagacc
      601 aaataataga catgcttatg taggtattgc tgtgatttgg gtccttgctg tggcttcttc
      661 tttgcctttc ctgatctacc aagtaatgac tgatgagccg ttccaaaatg taacacttga
```

721 tgcgtacaaa gacaaatacg tgtgctttga tcaatttcca tcggactctc ataggttgtc
781 ttataccact ctcctcttgg tgctgcagta ttttggtcca ctttgtttta tatttatttg
841 ctacttcaag atatatatac gcctaaaaag gagaaacaac atgatggaca agatgagaga
901 caataagtac aggtccagtg aaaccaaaag aatcaatatc atgctgctct ccattgtggt
961 agcatttgca gtctgctggc tccctcttac catctttaac actgtgtttg attggaatca
1021 tcagatcatt gctacctgca accacaatct gttattcctg ctctgccacc tcacagcaat
1081 gatatccact tgtgtcaacc ccatatttta tgggttcctg aacaaaaact tccagagaga
1141 cttgcagttc ttcttcaact tttgtgattt ccggtctcgg gatgatgatt atgaaacaat
1201 agccatgtcc acgatgcaca cagatgtttc caaaacttct ttgaagcaag caagcccagt
1261 cgcatttaaa aaaatcaaca acaatgatga taatgaaaaa atctgaaact acttatagcc
1321 tatggtcccg gatgacatct gtttaaaaac aagcacaacc tgcaacatac tttgattacc
1381 tgttctccca aggaatgggg ttgaaatcat ttgaaaatga ctaagatttt cttgtcttgc
1441 tttttttactg cttttgttgt agtgtcataa ttacatttgg aacaaaaggt gtgggctttg
1501 gggtcttctg gaaatagttt tgaccagaca tctttgaagt gctttttgtg aatttatgca
1561 tataatataa agacttttat actgtactta ttggaatgaa atttctttaa agtattacga
1621 tnnnctgact tcagaagtac ctgccatcca atacggtcat tagattgggt catcttgatt
1681 agattagatt agattagatt gtcaacagat tgggccatcc ttactttatg ataggcatca
1741 ttttagtgtg ttacaatagt aacagtatgc aaaagcagca ttcaggagcc gaaagatagt
1801 cttgaagtca ttcagaagtg gtttgaggtt tctgtttttt ggtggttttt gtttgttttt
1861 tttttttttc accttaaggg aggctttcat ttcctcccga ctgattgtca cttaaatcaa
1921 aatttaaaaa tgaataaaaa gacatacttc tcagctgcaa atattatgga gaattgggca
1981 cccacaggaa tgaagagaga aagcagctcc ccaacttcaa aaccattttg gtacctgaca
2041 acaagagcat tttagagtaa ttaatttaat aaagtaaatt agtattgctg caaatagcta
2101 aattatattt atttgaattg atggtcaaga gattttccat tttttttaca gactgttcag
2161 tgtttgtcaa gcttctggtc taatatgtac tcgaaagact ttccgcttac aatttgtaga
2221 aacacaaata tcgttttcca tacagcagtg cctatatagt gactgatttt aactttcaat
2281 gtccatcttt caaaggaagt aacaccaagg tacaatgtta aaggaatatt cactttacct
2341 agcagggaaa aatacacaaa aactgcagat acttcatata gcccatttta acttgtataa
2401 actgtgtgac ttgtggcgtc ttataaataa tgcactgtaa agattactga atagttgtgt
2461 catgttaatg tgcctaattt catgtatctt gtaatcatga ttgagcctca gaatcatttg
2521 gagaaactat attttaaaga acaagacata cttcaatgta ttatacagat aaagtattac
2581 atgtgtttga ttttaaaagg gcggacattt tattaaaatc aagg

304

## 6. NPY Y2 Receptor

```
LOCUS       HSU36269     1200 bp    mRNA            PRI       14-NOV-1995
DEFINITION  Human neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor mRNA, complete cds.
ACCESSION   U36269
NID         g1063633
VERSION     U36269.1  GI:1063633
KEYWORDS    .
SOURCE      Human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1200)
  AUTHORS   Gerald,C., Walker,M.W., Vaysse,P.J., He,C., Branchek,T.A. and
            Weinshank,R.L.
  TITLE     Expression cloning and pharmacological characterization of a human
            hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 270 (45), 26758-26761 (1995)
  MEDLINE   96070760
REFERENCE   2  (bases 1 to 1200)
  AUTHORS   Gerald,C.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (13-SEP-1995) Christophe A. Gerald, Synaptic
            Pharmaceutical Corporation, Molecular Biology, 215 College Road,
            Paramus, NJ 07652, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1200
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /clone="hhY2"
                     /sex="male"
                     /tissue_type="brain hippocampus"
                     /dev_stage="adult"
     5'UTR           1..20
     CDS             21..1166
                     /note="NPY/PYY Y2 receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor"
                     /protein_id="AAC50281.1"
                     /db_xref="PID:g1063634"
                     /db_xref="GI:1063634"
                     /translation="MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGPQTTPRGELVPDPEPELIDST
                     KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTL
                     CLPFTLTYTLMGEWKMGPVLCHLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKI
                     SKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEKSIYGTV
                     YSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAANDHYHQRRQKTTKMLVCVVVV
                     FAVSWLPLHAFQLAVDIDSQVLDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRK
                     AFLSAFRCEQRLDAIHSEVSVTFKAKKNLEVRKNSGPNDSFTEATNV"
     3'UTR           1164..1200
```

```
BASE COUNT      292 a   295 c   299 g   314 t
ORIGIN
        1 caagtggacc tgtactgaaa atgggtccaa taggtgcaga ggctgatgag aaccagacag
       61 tggaagaaat gaaggtggaa caatacgggc cacaaacaac tcctagaggt gaactggtcc
      121 ctgaccctga gccagagctt atagatagta ccaagctgat tgaggtacaa gttgttctca
      181 tattggccta ctgctccatc atcttgcttg gggtaattgg caactccttg gtgatccatg
      241 tggtgatcaa attcaagagc atgcgcacag taaccaactt tttcattgcc aatctggctg
      301 tggcagatct tttggtgaac actctgtgtc taccgttcac tcttacctat accttaatgg
      361 gggagtggaa aatgggtcct gtcctgtgcc acctggtgcc ctatgcccag ggcctggcag
      421 tacaagtatc cacaatcacc ttgacagtaa ttgccctgga ccggcacagg tgcatcgtct
      481 accacctaga gagcaagatc tccaagcgaa tcagcttcct gattattggc ttggcctggg
      541 gcatcagtgc cctgctggca agtcccctgg ccatcttccg ggagtattcg ctgattgaga
      601 tcatcccgga ctttgagatt gtggcctgta ctgaaaagtg gcctggcgag gagaagagca
      661 tctatggcac tgtctatagt ctttcttcct tgttgatctt gtatgttttg cctctgggca
      721 ttatatcatt ttcctacact cgcatttgga gtaaattgaa gaaccatgtc agtcctggag
      781 ctgcaaatga ccactaccat cagcgaaggc aaaaaaccac caaaatgctg gtgtgtgtgg
      841 tggtggtgtt tgcggtcagc tggctgcctc tccatgcctt ccagcttgcc gttgacattg
      901 acagccaggt cctggacctg aaggagtaca aactcatctt cacagtgttc cacatcatcg
      961 ccatgtgctc cacttttgcc aatccccttc tctatggctg gatgaacagc aactacagaa
     1021 aggctttcct ctcggccttc cgctgtgagc agcggttgga tgccattcac tctgaggtgt
     1081 ccgtgacatt caaggctaaa aagaacctgg aggtcagaaa gaacagtggc cccaatgact
     1141 ctttcacaga ggctaccaat gtctaaggaa gctgtggtgt gaaaatgtat ggatgaattc
```

305

## 7. NPY Y5 Receptor

```
LOCUS       HSU66275     1370 bp    mRNA            PRI       18-OCT-1996
DEFINITION  Human neuropeptide Y5 receptor (NPYR5) mRNA, complete cds.
ACCESSION   U66275
NID         g1620655
VERSION     U66275.1  GI:1620655
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1370)
  AUTHORS   Hu,Y., Bloomquist,B.T., Cornfield,L.J., DeCarr,L.B.,
            Flores-Riveros,J.R., Friedman,L., Jiang,P., Lewis-Higgins,L.,
            Sadlowski,Y., Schaefer,J., Velazquez,N. and McCaleb,M.L.
  TITLE     Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor
            associated with feeding behavior
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 271 (42), 26315-26319 (1996)
  MEDLINE   96421636
REFERENCE   2  (bases 1 to 1370)
  AUTHORS   Hu,Y., Bloomquist,B.T., Cornfield,L.J., DeCarr,L.B.,
            Flores-Riveros,J.R., Friedman,L., Jiang,P., Lewis-Higgins,L.,
            Sadlowski,Y., Schaefer,J., Velazquez,N. and McCaleb,M.L.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-AUG-1996) Metabolic Disorders, Bayer Corporation, 400
            Morgan Lane, West Haven, CT 06516, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1370
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            18..1355
                     /gene="NPYR5"
     CDS             18..1355
                     /gene="NPYR5"
                     /function="G protein-coupled receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y5 receptor"
                     /protein_id="AAC50741.1"
                     /db_xref="PID:g1620656"
                     /db_xref="GI:1620656"
                     /translation="MDLELDEYYNKTLATENNTAATRNSDFPVWDDYKSSVDDLQYFL
                     IGLYTFVSLLGFMGNLLILMALMKKRNQKTTVNFLIGNLAFSDILVVLFCSPFTLTSV
                     LLDQWMFGKVMCHIMPFLQCVSVLVSTLILISIAIVRYHMIKHPISNNLTANHGYFLI
                     ATVWTLGFAICSPLPVFHSLVELQETFGSALLSSRYLCVESWPSDSYRIAFTISLLLV
                     QYILPLVCLTVSHTSVCRSISCGLSNKENRLEENEMINLTLHPSKKSGPQVKLSGSHK
                     WSYSFIKKHRRRYSKKTACVLPAPERPSQENHSRILPENFGSVRSQLSSSSKFIPGVP
                     TCFEIKPEENSDVHELRVKRSVTRIKKRSRSVFYRLTILILVFAVSWMPLHLFHVVTD
                     FNDNLISNRHFKLVYCICHLLGMMSCCLNPILYGFLNNGIKADLVSLIHCLHM"
```

```
BASE COUNT      392 a    263 c    257 g    458 t
ORIGIN
        1 ccaagcagga ctataatatg gatttagagc tcgacgagta ttataacaag acacttgcca
       61 cagagaataa tactgctgcc actcggaatt ctgatttccc agtctgggat gactataaaa
      121 gcagtgtaga tgacttacag tattttctga ttgggctcta tacatttgta agtcttcttg
      181 gctttatggg gaatctactt attttaatgg ctctcatgaa aaagcgtaat cagaagacta
      241 cggtaaactt cctcataggc aatctggcct tttctgatat cttggttgtg ctgttttgct
      301 cacctttcac actgacgtct gtcttgctgg atcagtggat gtttggcaaa gtcatgtgcc
      361 atattatgcc ttttcttcaa tgtgtgtcag ttttggtttc aactttaatt ttaatatcaa
      421 ttgccattgt caggtatcat atgataaaac atcccatatc taataattta acagcaaacc
      481 atggctactt tctgatagct actgtctgga cactaggttt tgccatctgt tctccccttc
      541 cagtgtttca cagtcttgtg gaacttcaag aaacatttgg ttcagcattg ctgagcagca
      601 ggtatttatg tgttgagtca tggccatctg attcatacag aattgccttt actatctctt
      661 tattgctagt tcagtatatt ctgcccttag tttgtcttac tgtaagtcat acaagtgtct
      721 gcagaagtat aagctgtgga ttgtccaaca aagaaaacag acttgaagaa aatgagatga
      781 tcaacttaac tcttcatcca tccaaaaaga gtgggcctca ggtgaaactc tctggcagcc
      841 ataaatggag ttattcattc atcaaaaaac acagaagaag atatagcaag aagacagcat
      901 gtgtgttacc tgctccagaa agaccttctc aagagaacca ctccagaata cttccagaaa
      961 actttggctc tgtaagaagt cagctctctt catccagtaa gttcatacca ggggtcccca
     1021 cttgctttga gataaaacct gaagaaaatt cagatgttca tgaattgaga gtaaaacgtt
     1081 ctgttacaag aataaaaaag agatctcgaa gtgttttcta cagactgacc atactgatat
     1141 tagtatttgc tgttagttgg atgccactac accttttcca tgtggtaact gattttaatg
     1201 acaatcttat ttcaaatagg catttcaagt tggtgtattg catttgtcat ttgttgggca
     1261 tgatgtcctg ttgtcttaat ccaattctat atgggtttct taataatggg attaaagctg
     1321 atttagtgtc ccttatacac tgtcttcata tgtaataatt ctcactgttt
```

306

## 8. VIP

```
LOCUS       VIP          1511 bp    mRNA            PRI       19-MAR-1999
DEFINITION  Homo sapiens vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA.
ACCESSION   NM_003381
NID         g4507896
VERSION     NM_003381.1  GI:4507896
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1511)
  AUTHORS   DeLamarter,J.F., Buell,G.N., Kawashima,E., Polak,J.M. and
            Bloom,S.R.
  TITLE     Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in
            bacterial cells
  JOURNAL   Peptides 6 Suppl 1, 95-102 (1985)
  MEDLINE   86016352
COMMENT     REFSEQ: This reference sequence was derived from M36634.
            PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
            that has not yet been subject to human review. The final curated
            reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1511
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579
                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
     .               /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331
BASE COUNT      541 a    255 c    276 g    439 t
ORIGIN
        1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
       61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
      121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
      181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
      241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
      301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
      361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
      421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
      481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
      541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
      601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
      661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
      721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
      781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
      841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
      901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
      961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
     1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
     1081 ataaaaagac attcttccaa aaagattttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
     1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
     1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
     1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
     1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
     1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
     1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
     1501 aaaaaaaaaa a
```

307

## 9. VPAC1 Receptor

```
LOCUS       VIP          1511 bp    mRNA            PRI       19-MAR-1999
DEFINITION  Homo sapiens vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA.
ACCESSION   NM_003381
NID         g4507896
VERSION     NM_003381.1  GI:4507896
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1511)
  AUTHORS   DeLamarter,J.F., Buell,G.N., Kawashima,E., Polak,J.M. and
            Bloom,S.R.
  TITLE     Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in
            bacterial cells
  JOURNAL   Peptides 6 Suppl 1, 95-102 (1985)
  MEDLINE   86016352
COMMENT     REFSEQ: This reference sequence was derived from M36634.
            PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
            that has not yet been subject to human review. The final curated
            reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1511
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579
                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
```

```
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331
BASE COUNT      541 a    255 c    276 g    439 t
ORIGIN
        1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
       61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
      121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
      181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
      241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
      301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
      361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
      421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
      481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
      541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
      601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
      661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
      721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
      781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
      841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
      901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
      961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
     1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
     1081 ataaaaagac attcttccaa aaagattttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
     1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
     1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
     1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
     1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
     1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
     1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
     1501 aaaaaaaaaa a
```

308

## 10. VPAC2 Receptor

```
LOCUS       HUMHVRP      1640 bp    mRNA            PRI       16-FEB-1995
DEFINITION  Human helodermin-preferring VIP receptor (VIP2/PACAP receptor)
            mRNA, complete cds.
ACCESSION   L36566
NID         g550477
VERSION     L36566.1  GI:550477
KEYWORDS    PACAP receptor; VIP receptor; helodermin-preferring VIP receptor.
SOURCE      Homo sapiens cDNA to mRNA.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1640)
  AUTHORS   Svoboda,M., Tastenoy,M., Van Rampelbergh,J., Goossens,J.F., De
            Neef,P., Waelbroeck,M. and Robberecht,P.
  TITLE     Molecular cloning and functional characterization of a human VIP
            receptor from SUP-T1 lymphoblasts
  JOURNAL   Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (3), 1617-1624 (1994)
  MEDLINE   95110300
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1640
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_line="SUP T1 lymphoblast"
                     /clone_lib="lamda ZAP II"
     sig_peptide     163..231
                     /note="putative; putative"
     CDS             163..1479
                     /note="human VIP2 receptor was previously called
                     'helodermin-preferring VIP receptor'; transmembrane
                     domains are located at positions: 637-696; 772-844;
                     880-948; 1003-1071; 1147-1209; 1243-1302.; Potential
                     glycosylation sites are located at :334-336; 424-426;
                     436-438."
                     /codon_start=1
                     /function="VIP and PACAP receptor"
                     /protein_id="AAC37569.1"
                     /db_xref="PID:g550478"
                     /db_xref="GI:550478"
                     /translation="MRTLLPPALLTCWLLAPVNSIHPECRFHLEIQEEETKCTELLRS
                     QTEKHKACSGVWDNITCWRPANVGETVTVPCPKVFSNFYSKAGNISKNCTSDGWSETF
                     PDFVDACGYSDPEDESKITFYILVKAIYTLGYSVSLMSLATGSIILCLFRKLHCTRNY
                     IHLNLFLSFILRAISVLVKDDVLYSSSGTLHCPDQPSSWVGCKLSLVFLQYCIMANFF
                     WLLVEGLYLHTLLVAMLPPRRCFLAYLLIGWGLPTVCIGAWTAARLYLEDTGCWDTND
                     HSVPWWVIRIPILISIIVNFVLFISIIRILLQKLTSPDVGGNDQSQYKRLAKSTLLLI
                     PLFGVHYMVFAVFPISISSKYQILFELCLGSFQGLVVAVLYCFLNSEVQCELKRKWRS
                     RCPTPSASRDYRVCGSSFSRNGSEGALQFHRASRAQSFLQTETSVI"
     mat_peptide     232..1476
```

```
                     /function="VIP and PACAP receptor"
BASE COUNT      315 a    512 c    461 g    352 t
ORIGIN
        1 cgggacgagg gggcggcccc cgcgctcggg gcgctcggct acagctgcgg ggcccgaggt
       61 ctccgcgcac tcgctcccgg cccatgctgg aggcggcgga acccggggga cctaggacgg
      121 aggcggcggg cgctgggcgg cccccggcac gctgagctcg ggatgcggac gctgctgcct
      181 cccgcgctgc tgacctgctg gctgctcgcc cccgtgaaca gcattcaccc agaatgccga
      241 tttcatctgg aaatacagga ggaagaaaca aaatgtacag agcttctgag gtctcaaaca
      301 gaaaaacaca aagcctgcag tggcgtctgg gacaacatca cgtgctggcg gcctgccaat
      361 gtgggagaga ccgtcacggt gccctgccca aaagtcttca gcaattttta cagcaaagca
      421 ggaaacataa gcaaaaactg tacgagtgac ggatggtcag agacgttccc agatttcgtc
      481 gatgcctgtg gctacagcga cccggaggat gagagcaaga tcacgtttta tattctggtg
      541 aaggccattt ataccctggg ctacagtgtc tctctgatgt ctcttgcaac aggaagcata
      601 attctgtgcc tcttcaggaa gctgcactgc accaggaatt acatccacct gaacctgttc
      661 ctgtccttca tcctgagagc catctcagtg ctggtcaagg acgacgttct ctactccagc
      721 tctggcacgt tgcactgccc tgaccagcca tcctcctggg tgggctgcaa gctgagcctg
      781 gtcttcctgc agtactgcat catggccaac ttcttctggc tgctggtgga ggggctctac
      841 ctccacaccc tcctggtggc catgctcccc cctagaaggt gcttcctggc ctacctcctg
      901 atcggatggg gcctccccac cgtctgcatc ggtgcatgga ctgcggccag gctctactta
      961 gaagacaccg gttgctggga tacaaacgac cacagtgtgc cctggtgggt catacgaata
     1021 ccgattttaa tttccatcat cgtcaatttt gtccttttca ttagtattat acgaattttg
     1081 ctgcagaagt taacatcccc agatgtcggc ggcaacgacc agtctcagta caagaggctg
     1141 gccaagtcca cgctcctgct tatcccgctg ttcggcgtcc actacatggt gtttgccgtg
     1201 tttcccatca gcatctcctc caaataccag atactgtttg agctgtgcct cgggtcgttc
     1261 cagggcctgg tggtggccgt cctctactgt ttcctgaaca gtgaggtgca gtgcgagctg
     1321 aagcgaaaat ggcgaagccg gtgcccgacc ccgtccgcga gccgggatta cagggtctgc
     1381 ggttcctcct tctcccacaa cggctcggag ggcgccctgc agttccaccg cgcgtcccga
     1441 gcccagtcct tcctgcaaac ggagacctcg gtcatctagc cccacccctg cctgtcggac
     1501 gcggcgggag gcccacggtt cggggcttct gcggggctga gacgccggct tcctccttcc
     1561 agatgcccga gcaccgtgtc gggcaggtca gcgcggtcct gactccgtca agctggttgt
     1621 ccactaaacc ccatacctgg
```

## ABBREVIATIONS

FSD = female sexual dysfunction
FSAD = female sexual arousal disorder

cAMP = cyclic adenosine-3',5'-monophosphate
cGMP = cyclic guanosine-3',5'-monophosphate

$P_{cAMP}$ = potentiator of cAMP
$P_{cGMP}$ = potentiator of cGMP

$A_{cAMP}$ = activator of cAMP
$A_{cGMP}$ = activator of cGMP

$AM_{cAMP}$ = adverse modulator of cAMP
$AM_{cGMP}$ = adverse modulator of cGMP

$I_{cAMP}$ = inhibitor of cAMP
$I_{cGMP}$ = inhibitor of cGMP
$I{:}I_{cAMP}$ = inhibitor of an inhibitor of cAMP
$I{:}I_{cGMP}$ = inhibitor of an inhibitor of cGMP
$I{:}AM_{cAMP}$ = inhibitor of an adverse modulator of cAMP
$I{:}AM_{cGMP}$ = inhibitor of an adverse modulator of cGMP
$U{:}A_{cAMP}$ = upregulator of activator of cAMP
$U{:}A_{cGMP}$ = upregulator of activator of cGMP

AC = adenylate cyclase
A:AC = activator of AC

NEP = neutral endopeptidase
I:NEP = inhibitor of NEP

VIP = vasoactive intestinal peptide
VIPr = receptor of VIP (may be expressed as VIPR)
$VIP_n$ = receptor sub-type of VIP (such as VIPR1, VIPR2)
A:VIPr = activator of VIPr
$A{:}VIP_n$ = activator of $VIP_n$

## CLAIMS

1. A pharmaceutical composition for subsequent use in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

2. A pharmaceutical composition according to claim 1 wherein the agent is a mediator of vaginal vasorelaxation.

3. A pharmaceutical composition according to claim 1 or claim 2 wherein the composition is for oral administration.

4. Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

5. Use according to claim 4 wherein the agent is a mediator of vaginal vasorelaxation.

6. Use according to claim 4 or claim 5 wherein the medicament is for oral administration.

7. A method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

8. A method according to claim 7 wherein the agent is a mediator of vaginal vasorelaxation.

9. A method according to claim 7 or claim 8 wherein the agent is orally administered.

311 Fs

18. A diagnostic method, the method comprising isolating a sample from a female; determining whether the sample contains an entity present in such an amount to cause FSAD or is in an amount so as to cause FSAD; wherein the entity has a direct or indirect effect on the level or activity of cAMP in the sexual genitalia of the female.

19. A diagnostic composition or kit comprising means for detecting an entity in an isolated female sample; wherein the means can be used to determine whether the sample contains the entity and in such an amount to cause FSAD or is in an amount so as to cause FSAD; wherein the entity has a direct or indirect effect on the level or activity of cAMP in the sexual genitalia of the female.

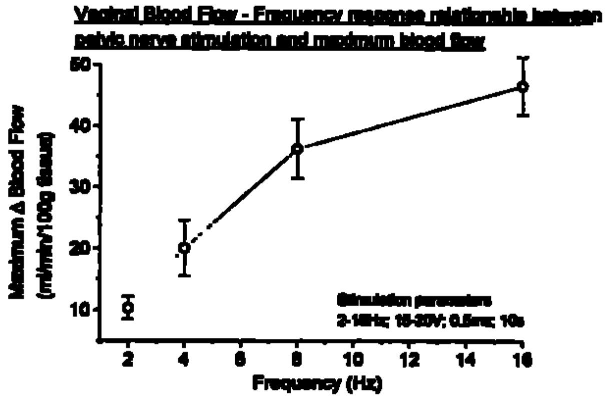
20. An animal model used to identify agents capable of treating FSD (in particular FSAD), said model comprising an anaesthetised female animal including means to measure changes in vaginal blood flow of said animal following stimulation of the pelvic nerve thereof.

21. An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSAD, the assay method comprising: administering an agent to the animal model of claim 20; and measuring any potentiation of cAMP and/or increase in blood flow in the vagina of said animal.

22. An agent identified by the assay method according to claim 21.

312

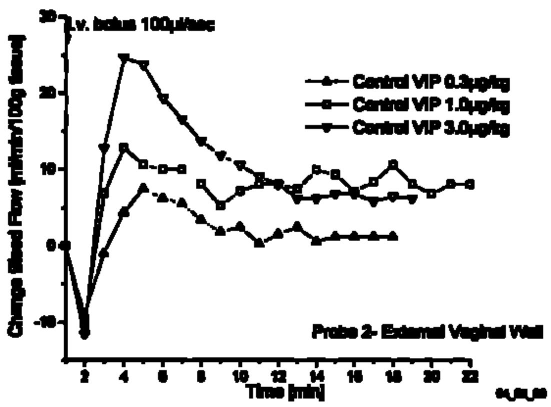
Figure 1

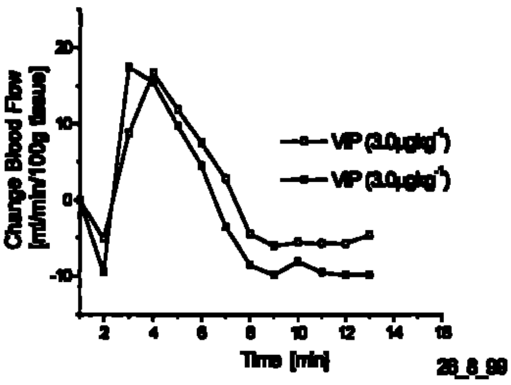


1/8

313

**Figure 2**


Effect of VIP on Blood Flow in the Vaginal Wall

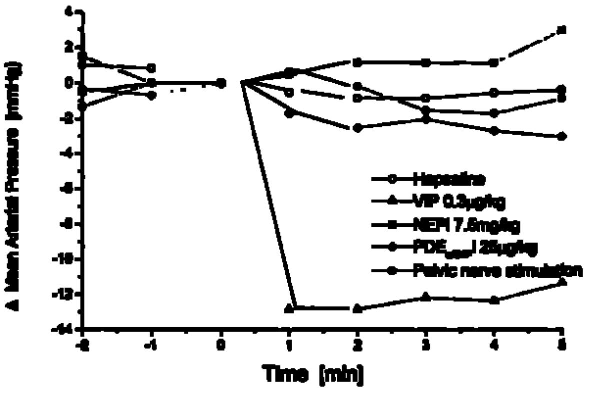

Effects of repetitive infusions of VIP on vaginal blood flow

2/8

314

**Figure 3**

Effect of VIP, an NEP Inhibitor, a $PDE_{cGMP}$ Inhibitor or Pelvic Nerve Stimulation on Mean Arterial Pressure in the Anaesthetised Rabbit



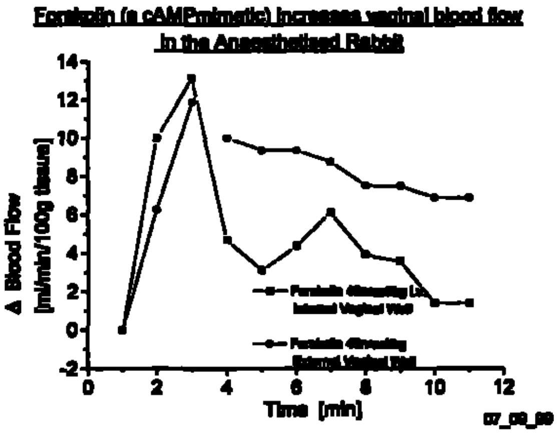
22_10_99

3/8

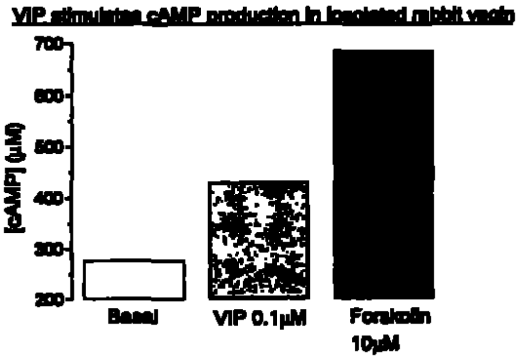
315

## Figure 4

**4a**

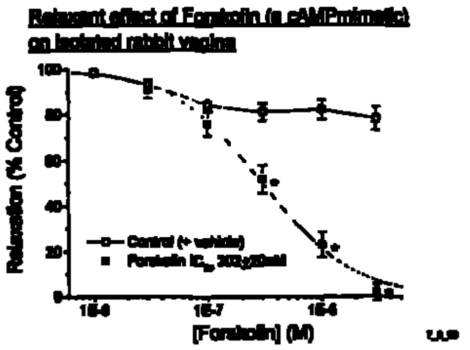


)



**4b)**

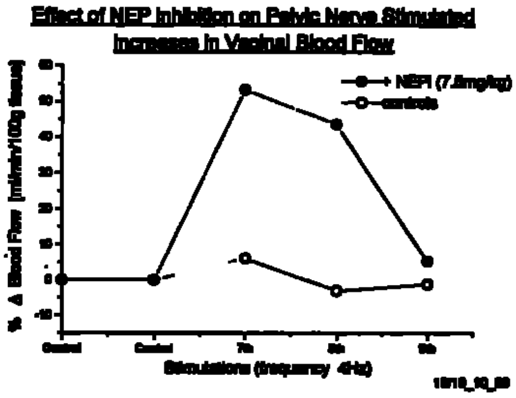
**4c)**



4/6

316

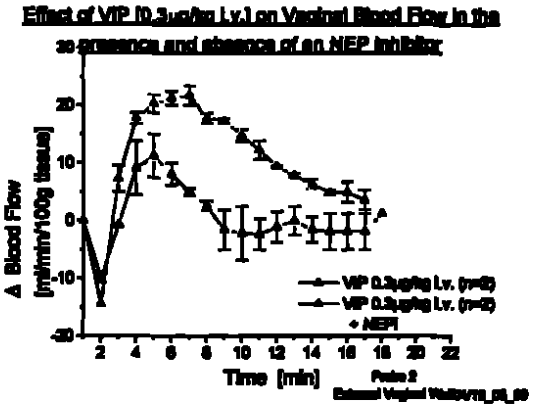
Figure 5



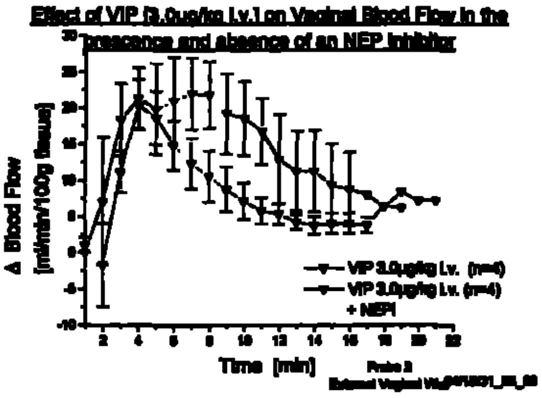
5/8

317

Figure 6



Effect of VIP (0.3µg/kg i.v.) on Vaginal Blood Flow in the presence and absence of an NEP inhibitor



Effect of VIP (3.0µg/kg i.v.) on Vaginal Blood Flow in the presence and absence of an NEP inhibitor

6/8

Figure 7

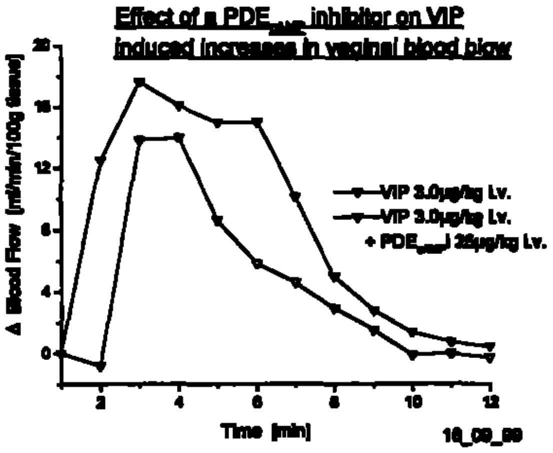
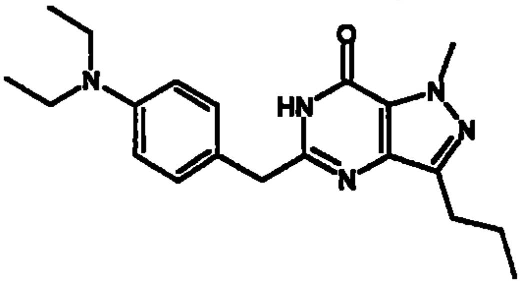
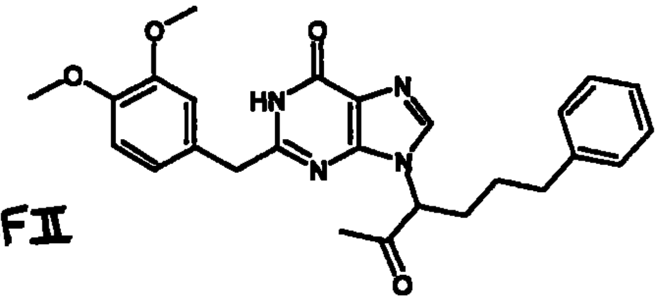

Effect of a PDE inhibitor on VIP induced increases in vaginal blood blow
Δ Blood Flow [ml/min/100g tissue]
20
16
12
8
4
0
2
4
6
8
10
12
Time [min]
VIP 3.0µg/kg i.v.
VIP 3.0µg/kg i.v. + PDE I 25µg/kg i.v.
10_09_99

FIGURE 8

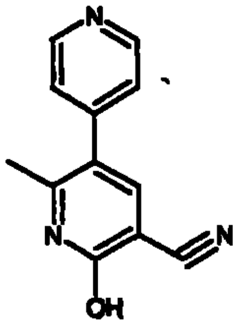
319 ~~210~~



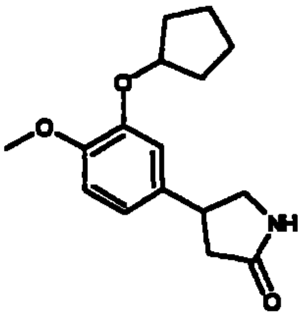
F I



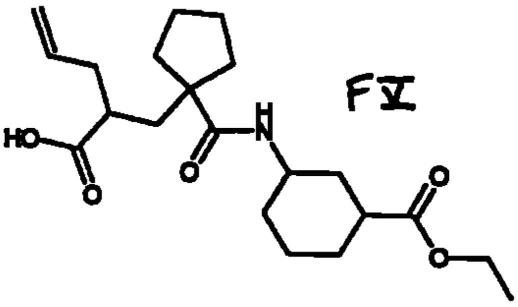
F II



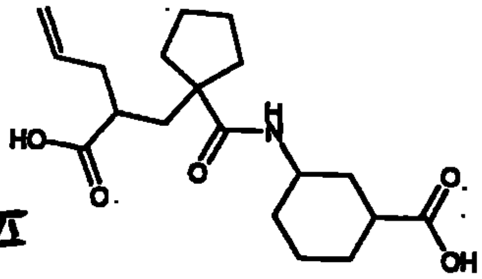
F III



F IV



F V



F VI

8/8

[illegible] MORENO
[illegible] 113
MADRID
Telf. [illegible]

# OFICINA DE PATENTES

Oficina de Patentes
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

El abajo firmante, siendo funcionario debidamente autorizado de acuerdo con la Sección 74(1) y (4) de la Ley de 1994 de Regulación y Contratación exterior, para firmar y expedir certificados por cuenta del Interventor General, certificó que, adjunto al presente documento se encuentra una copia exacta de los documentos presentados originalmente con relación a la solicitud de Patente identificada aquí.

Si, de acuerdo con las Normas de Patentes de 1.982 (Re-registro de Compañías) una compañía nombrada en el presente certificado y en cualesquiera documentos que lo acompañan ha sido re-registrada al amparo de la Ley de Sociedades de 1.980 con el mismo nombre con el cual había sido registrada inmediatamente antes de su re-registro salvo la sustitución, o la inclusión, como última parte del nombre, de las palabras "sociedad de responsabilidad limitada" o sus equivalentes en Galés, las referencias al nombre de la compañía en este certificado y en cualesquiera documentos que le acompañan deberán ser tratados como referencias al nombre con el cual esté re-registrada.

De acuerdo con las reglas, las palabras "sociedad a responsabilidad limitada" pueden ser sustituidas por p.l.c., plc. P.L.C. o PLC.

El re-registro bajo la Ley de Sociedades no constituye una nueva entidad legal sino que somete simplemente la sociedad a ciertas normas adicionales de la Ley de sociedades.

Firmado: Ilegible

Fecha: 1 agosto 2000

Agencia Ejecutiva del Ministerio de Comercio e Industria

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible]AN
INO[illegible]
Tel

IMPRESO 1/77
Ley de Patentes 1977
(Regla 16)

1/77

## OFICINA DE PATENTES

Solicitud de concesión de una patente
(ver las notas por detrás de este impreso.
También puede conseguir un folleto explicatorio
de la Oficina de Patentes para rellenar este impreso)

Oficina de Patentes
Cardiff Road
Newport
Gwent NP9 1RH

---

1. Su referencia P008448GB CTH

2. Solicitud de patente número 0004021.2 18 FEB 2000
(La Oficina de Patentes rellenará este apartado)

3. Nombre completo, dirección y código postal del solicitante o solicitantes (subrayar los apellidos)

Pfizer Limited
Ramsgate Road
Sandwich
Kent
CT13 9NJ

Número de ADP (si se conoce) 6892573001

Si el solicitante el una empresa, indicar el país/estado de su incorporación REINO UNIDO

4. Título de la invención PRODUCTO FARMACÉUTICO

5. Nombre de su agente (si lo tiene)

"Dirección" en el Reino Unido donde debería enviarse toda la correspondencia. (incluyendo el códico postal)

D. YOUNG & CO
21 NEW FETTER LANE
LONDON
EC4A 1DA

Número de ADP (si lo conoce) 59006

6. Si va a declarar prioridad por una o más solicitudes de patentes anteriores, indice el país y la fecha de solicitud de cada una de las solicitudes anteriores (si lo conoce) y el número de solicitud de las mismas

| País | número de solicitud de prioridad (si lo conoce) | Fecha (día/mes/año) |
|---|---|---|

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL. [illegible]
C. [illegible] 13
Teléf. [illegible] MADRID

7. Si esta solicitud es una divisional o derivada de una solicitud británica anterior, indicar el número y fecha de la solicitud anterior

Número de la solicitud anterior    Fecha de solicitud

---

8. ¿Se requiere una declaración de inventor y de derecho de concesión de una patente para mantener esta petición? (responder si en caso: SI
   a) algún solicitante nombrado en el apartado 3 no es un inventor, o
   b) hay un inventor quien es nombrado como un solicitante, o
   c) algún solicitante nombrado es una empresa
   Ver nota (d)

---

9. Poner el número de páginas para cada uno de los siguientes requisitos que está solicitando en este impreso.
No contar copias del mismo documento

Hojas de continuación de este impreso

| | |
|---|---|
| Descripción | 140 |
| Reivindicaciones | 3 |
| Resumen | 1 |
| Dibujos | 8 + 8 |

---

10. Si también está solicitando alguna de las siguientes, declare cuantos de cada requisito.

| | |
|---|---|
| Documentos de Prioridad | 0 |
| Traducción de los Documentos de Prioridad | 0 |
| Declaración de los inventores y derecho de concesión de una patente (impreso de patente 1/77) | 0 |
| Solicitud de examen preliminar y búsqueda (impreso de patente 1/77) | 0 |
| Solicitud de examen substantivo (impreso de patente 1/77) | 0 |

Otros documentos (especificar) CARTA

---

11. Solicitamos la concesión de una patente basada ne esta solicitud
Firma Ilegible Fecha 18 de febrero de 00
D YOUNG & CO
Agentes de los solicitantes

PATRICIA [illegible] MORENO

12. Nombre y número de teléfono de la persona de contacto en el Reino Unido — Dr. C T Harding 023 8063 4816

**Advertencia**
Despues de haber sido presentada una solicitud de Patente, el Interventor de la Oficina de Patentes estudiará si la publicación o la comunicación de la invención ha de ser prohibida o restringida de acuerdo con la Sección 22 de la Ley de Patentes de 1.997, y dará a conocer al solicitante si esta prohibición o esta restricción es necesaria. Se recuerda igualmente a los solicitantes que residen en el Reino Unido que las solicitudes no pueden ser presentadas fuera del país sin autorización escrita a no ser que una solicitud haya sido presentada en un plazo no inferior a 6 semanas, anteriormente, en el Reino Unido para una patente relacionada con la misma invención y si no se les ha dado ninguna instrucción prohibiendo la publicación o la comunicación o la revocación de esta instrucción.

**Notas**
a) Si usted necesita ayuda para rellenar este impreso o tiene alguna pregunta, por favor póngase en contacto con la Oficina de Patentes en 0645 500505
b) Sírvanse escribir a máquina, o con tinta negra utilizando letras mayúsculas. Una
c) Si no hay suficiente espacio para todos los detalles pertinentes en cualquier apartado de este impreso, por favor continúe en hoja aparte y escriba "ver hoja complementaria" en la parte(s) pertinente. Cualquier hoja complementaria debería adjuntarse a este impreso.
d) Si usted ha contestado "Si" necesitará rellenar el impreso de patente 7/77.
f) Para los detalles de la tasa y forma de pago, sírvanse consultar la Oficina de Patentes

MORENO
...AN
...RID
Telf.

p8448GB.doc

GB 0004021.2 solicitada el 18 de febrero de 2000

# PRODUCTO FARMACEUTICO

## AMBITO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un producto farmacéutico que es útil para el tratamiento de la disfunción sexual femenina (FSD), en particular de trastornos de la excitación sexual femenina (FSAD).

La presente invención se refiere también a un procedimiento de tratamiento de FSD, en particular de FSAD.

La presente invención se refiere también a ensayos para rastrear compuestos útiles en el tratamiento de FSD, en particular de FSAD.

Por conveniencia, se presenta una lista de las abreviaturas que se utilizan en el siguiente texto antes de la sección de reivindicaciones.

## RESPUESTA SEXUAL FEMENINA

La fase de excitación de la respuesta sexual femenina no se distinge fácilmente de la fase de deseo hasta que empiezan a tener lugar cambios fisiológicos en la vagina y clítoris así como en otros órganos sexuales. La excitación y placer sexuales están acompañados por una

MORENO
13
Tel.

combinación de eventos vasculares y neuromusculares que conducen a la congestión del clítoris, labios y pared vaginal, a un aumento de lubricación vaginal y de dilatación del lumen vaginal (Levin, 1980, Ottesen, 1983, Levin, 1991, Levin, 1992, Sjoberg, 1992, Wagner, 1992, Schiavi et al., 1995, Masters et al., 1996, Berman et al., 1999).

La congestión vaginal posibilita que tenga lugar la trasudación, y este proceso es responsable del aumento de la lubricación vaginal. La trasudación permite un flujo de plasma a través del epitelio sobre la superficie de la vagina, la fuerza motriz del cual es el aumento del flujo sanguíneo en el lecho capilar vaginal durante el estado excitado. Además, la congestión conduce a un aumento de la longitud vaginal y del diámetro luminar, especialmente en los dos tercios distales del canal vaginal. La dilatación luminar de la vagina se debe a una combinación de relajación del músculo liso de esta pared y relajación del músculo esquelético de los músculos del suelo pélvico. Algunos trastornos de dolor sexual, como vaginismo, se piensa que son debidos, al menos en parte, a una inadecuada relajación que evita la dilatación de la vagina, todavía debe determinarse si este es un problema principalmente de músculo liso o esquelético. (Levin, 1980, Ottesen, 1983, Levin, 1991, Sjoberg, 1992, Wagner, 1992, Schiavi et al., 1995, Master et al., 1996, Berman et al., 1999).

La vasculatura y microvasculatura de la vagina están inervadas por nervios que contienen neuropéptidos y otros candidatos a neurotransmisores. Estos incluyen el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), el neuropéptido Y (NPY), la sintasa de ácido nítrico (NOS), la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), (Hoyle et al., 1996). Los péptidos que están presentes en el clítoris se discuten a continuación. La sintasa de ácido nítrico, que se colocaliza a menudo con VIP, muestra una mayor expresión, inmunológicamente, en las arterias y venas profundas que en los vasos sanguíneos propios (Hoyle et al., 1996).

## DISFUNCION SEXUAL FEMENINA

Se sabe que algunos individuos pueden sufrir disfunción sexual femenina (FSD).

La FSD se define como la dificultad o incapacidad de una mujer de encontrar satisfación en la expresión sexual. La FSD es un término colectivo para varias enfermedades sexuales femeninas (Leiblum, 1998, Berman et al., 1999). La mujer puede tener falta de deseo, dificultad con la

MORENO
MADRID

excitación u orgasmo, dolor en el coito o una combinación de estos problemas. Algunos tipos de enfermedades, medicaciones, heridas o problemas psicológicos pueden producir la FSD. Los tratamientos en desarrollo están dirigidos a tratar tipos específicos de FSD, predominantemente los trastornos de deseo y excitación.

Las categorías de la FSD se definen mejor por contraste con las fases de la respuesta sexual femenina normal: deseo, excitación y orgasmo (Leiblum, 1998). El deseo o líbido es el motor de la expresión sexual, y sus manifestaciones incluyen a menudo pensamientos sexuales junto con un compañero interesado o al exponerse a otros estímulos sexuales. La excitación es la respuesta vascular a la estimulación sexual, un componente importante de la cual es la lubricación vaginal y la elongación de la vagina. El orgasmo es la liberación de la tensión sexual que ha culminado durante la excitación.

Por ello, la FSD aparece típicamente cuando una mujer tiene una respuesa inadecuada o insatisfactoria en cualquiera de estas fases, habitualmente deseo, excitación u orgasmo. Las categorías de FSD incluyen trastorno del deseo sexaul hipoactivo, trastorno de la excitación sexual, trastornos orgásmicos y trastornos de dolor sexual.

MORENO
113
MADRID

El trastorno del deseo sexual hipoactivo está presente si una mujer no tiene deseo, o poco, de ser sexual, y no tiene pensamientos o fantasías sexuales, o pocas. Este tipo de FSD puede producirse por niveles bajos de testosterona, debidos a la menopausia natural o a menopausia quirúrgica. Otras causas incluyen enfermedad, medicaciones, fatiga, depresión y ansiedad.

El trastorno de la excitación sexual (FSAD) se caracteriza por una respuesta genital inadecuada a la estimulación sexual. Los genitales no experimentan la congestión que caracteriza la excitación sexual normal. Las paredes vaginales están poco lubricadas, de modo que el coito es doloroso. Los orgasmos pueden estar imposibilitados. El trastorno de la excitación puede estar producido por una reducción de estrógenos en la menopausia o después de un parto y durante la lactancia, así como por enfermedad, con componentes vasculares como diabetes y aterosclerosis. Otras causas son resultado del tratamiento con diuréticos, antihistaminas, agentes antidepresivos, por ejemplo SSRI o antihipertensivos.

Los trastornos de dolor sexual (que incluyen dispareunia y vaginismo) se caracterizan por dolor como resultado de la penetración y pueden estar causados por medicaciones que

[illegible] MORENO [illegible] MAN [illegible] RID

reducen la lubricación, endometriosis, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad intestinal inflamatoria o problemas del tracto urinario.

La prevalencia de la FSD es difícil de calibrar debido a que el término cubre varios tipos de problemas, algunos de los cuales son difíciles de medir, y debido a que el interés en tratar la FSD es relativamente reciente. Muchos problemas sexuales de las mujeres están asociados directamente al proceso de envejecimiento femenino o a enfermedades crónicas como diabetes e hipertensión.

Existen amplias variaciones en la incidencia y prevalencia comunicadas de la FSD, explicadas en parte por el uso de criterios de evaluación diferentes, pero la mayoría de los investigadores comunica que una proporción significativa de mujeres por lo demás sanas tiene síntomas de uno o más de los subgrupos FSD.

Como ejemplo, los estudios que comparan la disfunción sexual en parejas revelan que el 63% de las mujeres tienen disfunción de excitación u orgásmica, comparado con el 40% de los hombres que tienen disfunción eréctil o eyaculatoria (Frank et al., 1978).

PATRICIA ... MORENO
ING ... MADRID
Télf. ...

Sin embargo, la prevalencia del trastorno de la excitación sexual femenina varía considerablemente de estudio a estudio. En un reciente estudio de National Health and Social Life, el 19% de las mujeres comunicaron dificultades de lubricación, mientras que el 14% de las mujeres de una clínica ginecológica ambulante comunicaron dificultades similares con la lubricación (Rosen et al., 1993).

Varios estudios han informado también de disfunción con la excitación sexual en mujeres diabéticas (hasta un 47%), incluyendo reducción de la lubricación vaginal (Wincze et al., 1993). No hubo asociación entre neuropatía y disfunción sexual.

Numerosos estudios han mostrado también que entre 11-48% de mujeres en conjunto pueden tener un deseo sexual reducido con la edad. De forma similar, entre 11-50% de las mujeres comunican problemas con la excitación y lubricación, y por lo tanto experimentan dolor en el coito. El vaginismo es menos común, afectando aproximadamente al 1% de las mujeres.

Los estudios de mujeres sexualmente experimentadas han detallado que el 5-10% tienen anorgasmia primaria. Otro 10% tiene orgasmos infrecuentes y otros 10% los experimenta

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL[illegible] Y [illegible]AN
[illegible]RID
Tel. [illegible]

inconsistentemente (Spector et al., 1990).

Debido a que la FSD consiste en varios subtipos que expresan síntomas en fases separadas del ciclo de respuesta sexual, no hay una terapia única. El tratamiento actual de la FSD se enfoca principalmente en temas psicológicos y de relación. El tratamiento de la FSD evoluciona gradualmente según se dedican más estudios clínicos y de ciencia básica a la investigación de este problema médico. Las dolencias sexuales femeninas no son todas psicológicas en su patofisiología, especialmente para aquellos individuos que pueden tener un componente de disfunción vasculogénica (por ejemplo FSAD) contribuyendo a la dolencia sexual femenina en conjunto. No existen actualmente medicamentos autorizados para el tratamiento de la FSD. La terapia de medicamentos empírica incluye la administración de estrógenos (tópicamente o en forma de una terapia de reemplazamiento hormonal), andrógenos o medicamentos de alteración del ánimo como buspirona o trazodona. Estas opciones de tratamiento a menudo son insatisfactorias debido a la baja eficacia o a efectos secundarios inaceptables.

Puesto que el interés en tratar la FSD farmacológicamente es relativamente reciente, la terapia consiste en los

PATRICIA ... MORENO
ING ... MADRID
Tel ...

siguiente: consejo psicológico, lubricantes sexuales sin receta médica y candidatos investigacionales, incluyendo medicamentos aprobados para otros estados. Estos medicamentos consisten en agentes hormonales, testosterona o combinaciones de estrógeno y testosterona, y más recientemente, medicamentos que se han probado efectivos en la disfunción eréctil masculina. Nunguno de estos agentes se ha demostrado que sea muy efectivo para tratar la FSD.

## TRASTORNO DE LA EXCITACION SEXUAL FEMENINA (FSAD)

El manual de diagnóstico y estadística (DSM) IV de la Asociación Psiquiátrica Americana define el trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) como:

> "*una incapacidad persistente o recurrente de alcanzar o mantener hasta la terminación de la actividad sexual una respuesta adecuada de lubricación-esponjamiento de excitación sexual. La alteración produce una notable tensión o dificultades interpersonales.*"

La respuesta de excitación consiste en vasocongestión de la pelvis, lubricación vaginal y expansión y esponjamiento

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] RID

de los genitales externos. La alteración produce una notable tensión y/o dificultades interpersonales. Los estudios que investigan la disfunción sexual en parejas revelan que el 63% de las mujeres tienen disfunción de excitación u orgásmica.

El FSAD es un trastorno sexual altamente prevalente que afecta a mujeres pre, peri y postmenopáusicas (±HRT). Está asociado a trastornos concomitantes como depresión, enfermedades cardiovasculares, diabetes y trastornos UG.

Las consecuencias primarias del FSAD son la falta de congestión/esponjamiento, falta de lubricación y falta de sensación genital placentera. Las consecuencias secundarias del FSAD son una reducción del deseo sexual, dolor durante el coito y dificultades para conseguir un orgasmo.

Recientemente se ha hipotetizado que existe una base vascular para la menos una parte de las pacientes con síntomas de FSAD (Goldstein et al., 1998) con datos animales que apoyan esta perspectiva (Park et al., 1997).

Los medicamentos candidatos para el tratamiento de FSAD, en los que se está investigando su eficacia, son principalmente terapias de disfunción eréctil que potencian

[illegible] MORENO
[illegible] S Y [illegible]
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

la circulación en los genitales masculinos. Consisten en dos tipos de formulación: medicación oral o sublingual (apomorfina, fentolamina, sildenafil) y prostaglandina ($PGE_1$) que se inyecta o administra transuretralmente en hombres, y tópicamente en los genitales de las mujeres.

La presente invención trata de proporcionar un medio eficaz de tratamiento de FSD.

## ASPECTOS RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se basa en los descubrimientos de que el FSAD está asociado con una reducción del flujo sanguíneo genital. El tratamiento de mujeres con FSAD puede llevarse a cabo por estimulación del flujo sanguíneo genital con agentes vasoactivos. Hemos mostrado claramente que el cAMP media la vasorrelajación vaginal y que el flujo sanguíneo vaginal puede estimularse/potenciarse por elevación de los niveles de cAMP. Este es el descubrimiento base.

A este respecto, nadie ha propuesto anteriormente que el FSAD pueda tratarse de tal manera, es decir elevación directa o indirecta de los niveles de cAMP. Además, no hay explicaciones en la técnica que sugieran que el FSAD estaba asociado con una modulación perjudicial de la actividad y/o

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL. S Y [illegible]
[illegible] 113
[illegible] ADRID

niveles de cAMP o que el cAMP es responsable de la mediación de la vasorrelajación vaginal. Por ello, la presente invención es sorprendente.

Por ello, en un aspecto amplio, la presente invención se refiere al uso de un potenciador de cAMP para tratar FSD, en particular FSAD.

La presente invención es ventajosa porque proporciona un medio para restablecer una respuesta de excitación sexual normal, es decir un aumento del flujo sanguíneo genital que conduce a la congestión vaginal y labial. Esto resultará en un aumento de la lubricación vaginal por trasudación de plasma, aumento de la flexibilidad vaginal y aumento de la sensibilidad vaginal. Por ello, la presente invención proporciona un medio de restablecer, o imitar, la respuesta de excitación sexual normal.

## ASPECTOS DETALLADOS DE LA PRESENTE INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso consigiente en el tratamiento de FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una mujer que sufre FSD, en

[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] MADRID

336

particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSD, en particular FSAD, siendo capaz el agente de potenciar cAMP en los genitales de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la mujer, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, le presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto un agente con cAMP, y medir la

PATRICIA MORENO
INGLES Y ALEMAN
13
MADRID

actividad de cAMP, siendo una potenciación del cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de FSD, en particular FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de: (a) realizar el ensayo según la presente invención, (b) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente la actividad de cAMP y (c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados.

En este aspecto, el agente identificado en la etapa (b) puede modificarse de modo que, por ejemplo, se maximice la actividad y después puede repetirse la etapa (a). Estas etapas pueden repetirse hasta que se alcance la actividad o perfil farmacocinético deseado.

Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de (a1) realizar el ensayo según la presente invención, (b1) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente la actividad de cAMP, (b2) modificar uno o más de los citados gentes identificados, (a2) repetir opcionalmente la etapa (a1) y (c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados (es decir, aquellos que han sido

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] RID

338

modificados).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de FSD, en particular FSAD, por potenciación in vivo de cAMP con un agente, siend capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP en un procedimiento de ensayo in vitro, siendo el procedimiento de ensayo in vitro el procedimiento de ensayo según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de FSD, en particular FSAD, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP al ensayar in vitro por el procedimiento de ensayo según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un modelo animal utilizado para identificar agentes capaces de tratar FSD (en particular FSAD), comprendiendo el citado modelo un animal hembra anestesiado inluyendo los medios para medir cambios en el flujo sanguíneo vaginal del citado animal a continuacion de la estimulación del nervio pélvico de éste.

MORENO
MAN
113
MADRID
Teléf.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: administrar un agente al modelo animal de la presente invención y medir cualquier potenciación de cAMP y/o aumento del flujo sanguíneo en la vagina del citado animal.

Para facilitar la referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se discuten ahora en los encabezados de sección apropiados. Sin embargo, las explicaciones de cada sección no están limitadas necesariamente a cada sección particular.

## ASPECTOS PREFERIDOS

Preferiblemente el agente es para el tratamiento de FSAD.

Preferiblemente el agente es un mediador de la vasorrelajación vaginal.

En una realización, el agente es preferiblemente para administración oral.

PATRICIA [illegible] MORENO
ING [illegible] AN
[illegible] 13
MADRID

En otra realización, el agente puede ser para administración tópica.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un efecto potenciador sobre cAMP. Expresado alternativamente, para algunas aplicaciones el agente no tiene preferiblemente un efecto potenciador directo sobre cAMP. Un ejemplo de agente que tiene un efecto potenciador directo es VIP administrado exógenamente. Sin embargo, se comprende que, en este aspecto preferido, el agente puede tener un efecto potenciador indirecto sobre cAMP actuando sobre agentes de actuación directa de origen y localización natural, como los VIP de origen y localización natural.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un inhibidor, es decir es capaz de exhibir una función inhibidora.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:PDE (a veces escrito como PDEi), más preferiblemente un I:PDEII (a veces escrito como I:PDE2 o PDEIIi o PDE2i).

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NEP (a veces escrito como NEPi).

PATRICIA ... MORENO
... MADRID
Telf. ...

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NPY (a veces escrito como NPYi).

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:PDEII selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NEP selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NPY selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente preferiblemente no produce, o es administrado de forma que no produzca, una caída prolongada en la presión sanguínea (por ejemplo durante un periodo de alrededor de 5 minutos o más). En esta realización, si el agente se administra tópicamente, entonces en agente puede tener la capacidad de producir una caída de la presión sanguínea (como si se suministrase por vía intravenosa), siempre que en la aplicación tópica pasen unos niveles mínimos de agente a la corriente sanguínea. Para un agente oral se prefiere que el agente no produzca una caída prolongada en la presión sanguínea.

En un aspecto preferido el agente no produce, o es administrado de forma que no produzca, un gran cambio en el ritmo cardiaco.

POTENCIACION de cAMP

Como se utiliza en la presente con referencia al cAMP, el término "potenciación" incluye cualquiera de: aumento de la eficacia de cAMP, aumento de los niveles de cAMP, aumento de la actividad de cAMP, reducción del nivel de la degradación de cAMP, reducción del nivel de inhibición de cAMP.

El efecto potenciador puede ser un efecto directo. Un ejemplo de efecto directo sería la sobrerregulación de los niveles de cAMP por un agente que aumenta la expresión de éste.

Como alternativa, el efecto potenciador podría ser un efecto indirecto. Un ejemplo de dicho efecto sería la acción de una sustancia que, de otra manera, inhibiría y/o reduciría los niveles y/o actividad de cAMP. Otro ejemplo de dicho efecto sería el aumento de la acción de una sustancia que aumenta la eficacia de cAMP, aumenta los niveles de cAMP, aumenta la actividad de CAMP, reduce el nivel de degradación de cAMP o reduce el nivel de

AN
13
MADRID
Teléf

inhibición de cAMP.

Como alternativa, el agente puede actuar incluso como un mimético de cAMP.

Miméticos de cAMP

Como se utiliza en la presente, el término "mimético de cAMP" significa un agente que puede actuar de modo similar (por ejemplo tener un perfil y efecto biológico similar) que el cAMP en los genitales sexuales femeninos, y hacerlo mediante uno o más de: aumento de la eficacia de los restos similares a cAMP, aumento de los niveles de restos similares a cAMP, aumento de la actividad de los restos similares a cAMP, reducción del nivel de degradación de los restos similares a cAMP, reducción del nivel de inhibición de los restos similares a cAMP.

De esta manera, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso consiguiente en el tratamiento de FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente

[illegible]

aceptable.

De esta manera, en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

De esta manera, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente en una cantidad que potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un ejemplo de mimético de cAMP sería la forskolina. Hemos encontrado que la forskolina aumenta el flujo sanguíneo vaginal y puede actuar también como relajante vaginal.

En un aspecto preferido, el mimético de cAMP se administra oralmente.

PATENTES [illegible] MADRID

ACTIVADOR DE cAMP

Como se utiliza en la presente, el término "activador de cAMP" significa una sustancia que controla o libera cAMP en los genitales sexuales femeninos. El control puede ser directo o indirecto. Para facilitar la referencia nos referimos a estas sustancias como $A_{cAMP}$.

OBJETIVO

El término "objetivo" como se utiliza en la presente con referencia a la presente invención significa cualquier sustancia que sea cAMP, un $A_{cAMP}$, un $I_{cAMP}$ o un $AM_{cAMP}$. Expresado de otra manera, el objetivo puede referirse como un objetivo $P_{cAMP}$.

El objetivo del agente de la presente invención puede ser una secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de nucleótidos que codifica la misma y/o una unidad de expresión responsable de la expresión de la misma y/o un modulador de la misma.

El objetivo puede ser incluso una combinación de dichos objetivos.

AGENTE

El agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un $P_{cAMP}$.

El agente puede ser una secuencia de aminoácidos o un derivado químico de ésta. La sustancia puede ser incluso un compuesto orgánico u otro compuesto químico. El agente puede incluso ser una secuencia de nucleótidos, que puede ser una secuencia sentido o una secuencia antisentido. El agente puede ser incluso un anticuerpo.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, como si el agente es un I:NEP, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente un grupo amida (es decir N(H)-C(O)- o incluso -C(O)-N(H)-) y uno o más grupos hidrocarburo. En este caso, el término "grupo hidrocarburo" significa un grupo que comprende al menos C y H y puede comprender opcionalmente uno o más sustituyentes adecuados. Ejemplos de dichos sustituyentes pueden incluir halo, alcoxi, nitro, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes pueden formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarburo comprende más de un C, estos carbonos no tienen porque estar unidos necesariamente unos a otros. Por ejemplo, al menos dos de los carbonos pueden estar unidos a través de un elemento o grupo adecuado. De esta manera, el grupo hidrocarburo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán aparentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente un grupo cíclico. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente un grupo cíclico unido a otro grupo hidrocarburo por medio de un enlace amida. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, como si el agente es un I:PDE, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente dos o más grupos hidrocarburo unidos. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente al menos dos grupos cíclicos, siendo uno de dichos grupos cíclicos una estructura de anillo cíclico condensado. Para algunas aplicaciones, al menos uno de los grupos cíclicos es preferiblemente un grupo heterocíclico. Para algunas aplicaciones, el grupo heterocíclico comprende preferiblemente al menos un N en el anillo. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos

PATENT
INC
RID
Teléf.

de la presente.

El $P_{cAMP}$ puede hacer una o más de las siguientes cosas: aumentar directa o indirectamente la eficacia del cAMP, aumentar directa o indirectamente los niveles de cAMP, aumentar directa o indirectamente la actividad de cAMP, reducir directa o indirectamente el nivel de degradación de cAMP o reducir directa o indirectamente el nivel de inhibición de cAMP.

Preferiblemente, el agente aumenta directa o indirectamente los niveles de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

Más preferiblemente, el agente aumenta selectivamente directa o indirectamente los niveles de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

En un aspecto, el agente puede inhibir o antagonizar un objetivo adecuado y, al hacerlo, potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales femeninos. En el texto hemos utilizado el término inhibidor para significar un inhibidor y/o antagonista.

En otro aspecto, el agente puede activar o agonizar un

PATRICIA [illegible] MORENO

objetivo adcuado y, al hacerlo, potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales femeninos. En el texto hemos utilizado los términos activador e inhibidor de sobrerregulación para significar activador y/o sobrerregulador y/o agonista.

De esta manera, el agente puede agonizar, sobrerregular o inhibir un objetivo adecuado.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, o además, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

Preferiblemente, el agente puede agonizar selectivamente, antagonizar selectivamente, sobrerregular selectivamente o inhibir selectivamente un objetivo adecuado.

Preferiblemente, el agente puede agonizar selectivamente, antagonizar selectivamente, sobrerregular selectivamente o inhibir selectivamente un objetivo selectivo adecuado.

El agente de la presente invención puede ser capaz también de mostrar una o más propiedades funcionales benficiosas más. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede potenciar cAMP así como potenciar cGMP. Para algunas aplicaciones (como para administración tópica), el agente puede mostrar también una acción inhibidora de ACE (enzima conversora de angiotensina). Para algunas aplicaciones (como con tipos particulares de paciente), dichos agentes (es decir aquellos que muestran acción inhibitoria ACE) pueden no ser adecuados para administración oral. Para algunas aplicaciones el agente puede mostrar también una acción inhibidora de ECE (enzima conversora de endotelio).

En un aspecto altamente preferido el agente no es VIP administrado exógenamente.

Esto es debido a que ha habido informes de que las infusiones de VIP conducen a efectos cardiovasculares adversos significativos, como aumentos del ritmo cardiaco y reducción de la presión sanguínea arterial diastólica (Ottesen 1983, 1987, 1995).

Además, aunque Ottesen y colaboradores han demostrado que VIP induce aumentos en el flujo sanguíneo vaginal y en la lubricación en voluntarias sanas, el mecanismo por el cual VIP ejerce sus efectos no está claro. En la literatura, existe una serie de ejemplos de señalización de VIP mediante distintos sistemas de segundo mensajero, por

PATRICIA [illegible] MORENO

ejemplo cGMP/guanilato ciclasa (Ashur-Fabian, 1999), monóxido de carbono (CO)/oxigenasa hemo (Fan et al., 1998) y cAMP/adenilato ciclasa (Foda, 1995, Schoeffter, 1985, Gu, 1992). Esto se ejemplifica en un informe reciente que describe cómo pueden explicarse los efectos vasorrelajantes de VIP en la arteria uterina por la liberación de óxido nítrico (Jovanovic, 1998). De nuevo, existen también evidencias de modulación de VIP por óxido nítrico (NO)/cGMP en la funnción urogenital masculina (Kim, 1994).

Por ello, es deseable que el agentes no sea VIP administrado exógenamente por sí solo. Sin embargo, la presente invención comprende combinaciones de agentes, siendo uno de estos agentes VIP. Sin embargo, se prefiere que ninguno de los agentes sea VIP administrado exógenamente por las razones anteriormente citadas.

El agente puede utilizarse en combinación con uno o más agentes farmacéuticamente activos como un $P_{cAMP}$ (Como Sildenafil) y/o un compuesto farmacéutico de actuación central (por ejemplo un agonista de dopamina, como apomorfina). Las explicaciones de la apomorfina como compuesto farmacéutico pueden encontrarse en el documento US-A-5945117. En ese documento en particular, la apomorfina se suministra por vía sublingual.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un valor de $K_i$ menor de alrededor de 100 nM, preferiblemente menor de alrededor de 75 nM, preferiblemente menor de alrededor de 50 nM, preferiblemente menor de alrededor de 25 nM, preferiblemente menor de alrededor de 20 nM, preferiblemente menor de alrededor de 15 nM, preferiblemente menor de alrededor de 10 nM, preferiblemente menor de alrededor de 5 nM.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un valor de $K_b$ menor de alrededor de 100 nM, preferiblemente menor de alrededor de 75 nM, preferiblemente menor de alrededor de 50 nM, preferiblemente menor de alrededor de 25 nM, preferiblemente menor de alrededor de 20 nM, preferiblemente menor de alrededor de 15 nM, preferiblemente menor de alrededor de 10 nM, preferiblemente menor de alrededor de 5 nM.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un valor de $K_a$ menor de alrededor de 100 nM, preferiblemente menor de alrededor de 75 nM, preferiblemente menor de alrededor de 50 nM, preferiblemente menor de alrededor de 25 nM, preferiblemente menor de alrededor de 20 nM, preferiblemente menor de alrededor de 15 nM, preferiblemente menor de alrededor de 10 nM, preferiblemente menor de alrededor de 5 nM.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente una selectividad de al menos alrededor de 100 veces hacia el objetivo deseado, preferiblemente una selectividad de al menos alrededor de 150 veces hacia el objetivo deseado, preferiblemente una selectividad de al menos alrededor de 200 veces hacia el objetivo deseado, preferiblemente una selectividad de al menos alrededor de 250 veces hacia el objetivo deseado, preferiblemente una selectividad de al menos alrededor de 300 veces hacia el objetivo deseado, preferiblemente una selectividad de al menos alrededor de 350 veces hacia el objetivo deseado.

Para algunas aplicaciones, el agente puede ser un agente vasoactivo.

## POTENCIACION DE cGMP

Como se utiliza en la presente con referencia al cGMP, el térmrin "potenciar" incluye uno o más de: aumento de la eficacia del cGMP, aumento de los niveles de cGMP, aumento de la actividad de cGMP, reducción del nivel de degradación de cGMP, reducción del nivel de inhibición de cGMP.

El efecto potenciador puede ser un efecto directo. Como alternativa, podría ser un efecto secundario y/o un efecto cadena abajo.

En este caso, el agente que potencia el cGMP actúa preferiblemente como un $I_{cGMP}$ y/o un $AM_{cGMP}$, teniendo el modulador de cGMP un efecto adverso sobre cGMP, de modo que el agente reduce y/o elimina y/o enmascara y/o desvía el efecto prejudicial del $I_{cGMP}$ y/o del $AM_{cGMP}$ hacia cGMP.

Por ello, la presente invención comprende una combinación de uno o más $I{:}I_{cAMP}$ y uno o más $I{:}I_{cGMP}$.

En un aspecto, el $I{:}I_{cGMP}$ es un $I{:}PDE_{cGMP}$.

## $I_{cAMP}$ Y/O $AM_{cAMP}$

Hemos mostrado que el cAMP media el flujo sanguíneo vaginal y estimulando la señalización por cAMP podemos estimular el flujo sanguíneo vaginal en un modelo animal. Así, un agente que sobrerregula/estimula la vasorrelajación mediada

PATRICIA KOCH MORENO
[illegible] RID

por cAMP será eficaz en el tratamiento de FSAD. Para facilitar la referencia, nos referimos a estas sustancias como $I_{cAMP}$ y/o $AM_{cAMP}$. En este caso, los $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ tienen un efecto adverso sobre los niveles de actividad de cAMP.

Por ello, el agente puede ser uno o más de: un I:$I_{cAMP}$ y/o un I:$AM_{cAMP}$.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

Los ejemplos de $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ incluyen uno o más de PDE, NPY y NEP, o cualquier componente asociado con éstos. El componente asociado puede ser, por ejemplo, un receptor y/o un cofactor.

De esta manera, el agente puede ser preferiblemente uno o más de: un I:$PDE_{cAMP}$, un I:NPY (a veces escrito como I:NPYi), un I:NPY $Y_n$ (a veces escrito como NPY $Y_n$I) y un I:NEP.

De manera similar, el agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades.

PATRICIA KEEN MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

### I:I$_{cAMP}$ Y/O I:AM$_{cAMP}$

Según la presente invención, hemos encontrado que es posible tratar y/o prevenir el FSAD utilizando un agente que reduce y/o elimina y/o enmascara y/o desvía y/o previene el efecto perjudicial de I$_{cAMP}$ y AM$_{cAMP}$ hacia cAMP. El agente puede incluso restablecer los niveles de cAMP que se habían reducido por el I$_{cAMP}$ y AM$_{cAMP}$. En este caso, el I:I$_{cAMP}$ e I:AM$_{cAMP}$ previenen o reducen el efecto adverso sobre los niveles de actividad del cAMP.

De esta manera, en un aspecto preferido, el agente es un I:I$_{cAMP}$ y/o un I:AM$_{cAMP}$, teniendo el I:AM$_{cAMP}$ un efecto perjudicial sobre AM$_{cAMP}$.

En un aspecto preferido, el agente puede ser uno o más de:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$ (donde n indica una clase o subclase apropiada)
I:NPY
I:NPY Y$_n$ (donde n indica una clase o subclase apropiada)

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

I:NEP

$\underline{A_{cAMP}}$

Según la presente invención, hemos encontrado que una de las causas importantes de FSAD es debida a los bajos niveles o baja actividad de cAMP en los genitales femeninos.

Por ello, el agente puede ser un U:$A_{cAMP}$.

Ejemplos de $A_{cAMP}$ incluyen VIP y AC, o cualquier componente asociado con ellos. El componente asociado puede ser, por ejemplo, un receptor y/o un cofactor.

De esta manera, el agente puede ser preferiblemente uno o más de: A:AC, A:VIOr, A:$VIP_n$, I:I:VIPr o I:I:$VIP_n$.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

PATENTAL ... MORENO
INC ... AN
... 113
... MADRID

## $U:A_{cAMP}$

En otro aspecto, el objetivo es preferiblemente un componente que aumenta el nivel de cAMP. Por ello, el agente puede ser un U:AC.

Como ejemplo, el objetivo puede ser el cAMP mismo o AC o VIP (o combinaciones de éstos).

Por ello, como ejemplo, el agente puede ser cualquiera de: un $U:A_{cAMP}$, un A:AC, un A:VIPr, un $A:VIP_n$, un I:I:VIPr o un $I:I:VIP_n$.

## COMBINACION DE $I:I_{cAMP}$ Y/O $I:M_{cAMP}$ Y/O $U:A_{cAMP}$

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede ser una combinación de potenciadores de cAMP. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede ser dos o más de:

$I:PDE_{cAMP}$
$I:PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
$U:A_{cAMP}$

PATENTES ... MORENO
INGS ... MADRID
Telé.

A:AC
A:VIPr
$A:VIP_n$
I:I:VIPr
$I:I:VIP_n$

### COMBINACION DE MIMETICO DE cAMP e $I:I_{cAMP}$ Y/O $I:M_{cAMP}$ Y/O $U:A_{cAMP}$

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede ser una combinación de un mimético de cAMP y uno o más potenciadores de cAMP. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede ser un mimético de cAMP y uno o más de:

$I:PDE_{cAMP}$
$I:PDEn_{cAMP}$
I:NPY
$I:NPY\ Y_n$
I:NEP
$U:A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
$A:VIP_n$
I:I:VIPr

MADRID
Telf.

I:I:$VIP_n$

## INHIBIDOR

El término "inhibidor", como se utiliza en la presente con respecto del agente de la presente invención, significa un agente que puede reducir y/o eliminar y/o enmascarar y/o evitar la acción perjudicial de un $I_{cAMP}$ y/o un $M_{cAMP}$ hacia cAMP. El inhibidor puede actuar como un antagonista.

## ACTIVADOR

El término "activador", como se utiliza en la presente con respecto del agente de la presente invención, significa un agente que puede aumentar y/o producir y/o desenmascarar y/o elevar y/o asegurar la acción de cAMP y/o un $A_{cAMP}$. El activador puede actuar como un agonista.

## OTROS COMPONENTES ACTIVOS

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede estar en combinación con uno o más de otros compuestos activos, como uno o más agentes capaces de potenciar cGMP.

## SECUENCIA DE AMINOACIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "proteína".

La secuencia de aminoácidos puede prepararse aislada de una fuente adecuada, o puede prepararse sintéticamente o puede prepararse mediante el uso de técnicas de DNA recombinante.

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de aminoácidos que es capaz de actuar como un objetivo en un ensayo para la identificación de uno o más agentes y/o derivados de éstos capaces de afectar a la secuencia de aminoácidos para potenciar el cAMP para tratar FSAD.

## SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de nucleótidos" es sinónimo del término "polinucleótido".

La secuencia de nucleótidos puede ser DNA o RNA de origen genómico, o sintético o recombinante. La secuencia de

[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

nucleótidos puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, representando la cadena sentido o antisentido o combinaciones de éstas.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente DNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos está preparada preferiblemente mediante el uso de técnicas de DNA recombinante (por ejemplo DNA recombinante).

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente cDNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos puede ser

PATE[illegible]
ING[illegible]
[illegible] ADRID
Telf. [illegible]

nucleótidos puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, representando la cadena sentido o antisentido o combinaciones de éstas.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente DNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos está preparada preferiblemente mediante el uso de técnicas de DNA recombinante (por ejemplo DNA recombinante).

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente cDNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos puede ser preferiblemente la misma que la forma de origen natural para este aspecto.

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una sustancia capaz de actuar como un objetivo en un ensayo (como un ensayo de dos híbridos de levadura) para la identificación de uno o más agentes y/o derivados de éstos capaces de afectar a la sustancia para potenciar el cAMP para tratar FSAD.

## VARIANTES/HOMOLOGOS/DERIVADOS

Además de las secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos específicas mencionadas en la presente, la presente invención comprende también el uso de variantes, homólogos y derivados de éstas. En este caso, el término "homología" puede igualarse a "identidad".

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos un 75, 85 o 90% idéntica, preferiblemente al menos un 95 o 98% idéntica. En particular, la homología debería considerarse con respecto a aquellas regiones de la secuencia (como los aminoácidos de las posiciones 51, 56 y 57) conocidas por ser esenciales para una actividad. Aunque la homología puede considerarse también en términos de similaridad (es decir residuos de aminoácidos con propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología pueden realizarse manualmente, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencia disponibles fácilmente. Estos programas de ordenador comercialmente disponibles pueden

PATENTES
ING
C.
Telf.
MADRID

calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina un alineamiento "sin huecos". Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se realizan sólo sobre un número relativamente pequeño de residuos.

Aunque este es un procedimiento muy simple y consistente, no consigue tener en consideración que, por ejemplo en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o deleción producirá que los siguientes residuos de aminoácidos estén colocados fuera de la alineación, dando como resultado potencialmente una gran reducción del % de homología cuando se realiza un alineamiento global. Consiguientemente, la mayoría de procedimientos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta las posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente la puntuación general de homología. Esto se consigue insertando "huecos" en el alineamiento de secuencia para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan "penalizaciones de huecos" a cada hueco que aparece en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una secuencia de aminoácidos con tan pocos huecos como sea posible, que reflejan una mayor relación entre las dos secuencias comparadas, conseguirán una mayor puntuación que una con muchos huecos. Los "costes de huecos afines" que se utilizan típicamente, cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco, y una penalización menor por cada consiguiente residuo en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más habitualmente utilizado. Las penalizaciones por huecos mayores darán lugar por supuesto a alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se utiliza dicho software para comparaciones de secuencia. Por ejemplo, al utilizar el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase a continuación) la penalización por hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

El cálculo del máximo % de homología requiere por lo tanto primeramente la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco. Un

PATRICIA KOCH MORENO

programa de ordenador adecuado para llevar a vabo dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, EE.UU., Devereux, et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencia incluyen, pero no están limitados a, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999, ibidem, capítulo 18), FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación GENEWORKS. Ambos BLAST y FASTA están disponibles para búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel et al., 1999, ibidem, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit.

Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el proceso de alineamiento mismo típicamente no está basado en comparación de pares todo-o-nada. En lugar de eso, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similaridad graduada que asigna puntuaciones a cada comparación emparejada basada en la similaridad química o distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz utilizada habitualmente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el conjunto BLAST de programas. El programa GCG Wisconsin utiliza generalmente los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos habituales si se suministra (véase manual del usuario para más detalles). Se prefiere utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz por defecto, como BLOSUM62.

Una vez el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software hace esto típicamente como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

Las secuencias pueden tener también deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una sustancia de funcionalidad equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden realizarse sobre la base de similaridad de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad, y/o naturaleza anfipática de los residuos siempre y cuando se retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos negativamente cargados incluyen ácido aspártico y ácido glutámico, los aminoácidos positivamente cargados incluyen lisina y arginina, y los aminoácidos con grupos de cabeza no cargados con valores de hidrofilicidad similar incluyen isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

PATRICIA KOCH MORENO
ING

Las sustituciones conservativas pueden realizarse, por ejemplo, según la tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna, y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna, pueden sustituirse unos a otros.

| | | |
|---|---|---|
| ALIFATICO | No polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar sin carga | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar cargado | D E |
| | | K R |
| AROMATICO | | H F W Y |

## VECTORES DE EXPRESION

La secuencia de nucleótidos para uso como objetivo o para expresar el objetivo puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede utilizarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos en y/o a partir de una célula huésped compatible. La expresión puede controlarse utilizando secuencias de control que incluyen promotores/estimuladores y otras señales de regulación de

PATRICIA [illegible]
ING

la expresión. Pueden utilizarse promotores procarióticos y promotores funcionales en células eucarióticas. Pueden utilizarse promotores específicos de tejido o específicos de estímulos. También pueden utilizarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes descritos anteriormente.

La proteína producida por una célula huésped recombinante por expresión de la secuencia de nucleótidos, puede segregarse o puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector utilizados. Las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de la sustancia codificada por las secuencias a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular.

## PROTEINAS DE FUSION

La secuencia de aminoácidos objetivo puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo como ayuda en la extracción y purificación. Ejemplos de compañeros de proteína de fusión incluyen glutation-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a DNA y/o activación transcripcional) y β-galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de corte proteolítico entre

PATRICIA [illegible] MORENO

el compañero de la proteína de fusión y la secuencia de proteína de interés para permitir la eliminación de las secuencias de la proteína de fusión. Preferiblemente la proteína de fusión no impedirá la actividad del objetivo.

La proteína de fusión puede comprender un antígeno o determinante antigénico condensado a la sustancia de la presente invención. En esta realización, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de origen no natural que comprende una sustancia que puede actuar como coadyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmune. El antígeno o determinante antigénico puede estar unido al extremo amino o carboxi de la sustancia.

En otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos puede estar ligada a una secuencia heteróloga que codifica una proteína de fusión. Por ejemplo, para rastrear genotecas de péptidos en busca de agentes capaces de afectar la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia quimérica que exprese un epitopo heterólogo que es reconocido por un anticuerpo disponible comercialmente.

## ANTICUERPOS

En una realización de la presente invención, el agente de la presente invención puede ser un anticuerpo.

Los anticuerpos pueden producirse por técnicas estándares, como por inmunización con la sustancia de la invención o utilizando una genoteca de muestra de fagos.

Con los fines de esta invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique otra cosa, incluye, pero no está limitado a, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos producidos por genoteca de expresión Fab. Dichos fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos enteros que retienen su actividad de unión para una sustancia objetivo, los fragmentos Fv, F(ab') y $F(ab')_2$, así como los anticuerpos de cadena simple (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión de antígeno del anticuerpo. Además, los anticuerpos y fragmentos de éstos pueden ser anticuerpos humanizados, por ejemplo como se describe en la sustancia A-239400. Los anticuerpos neutralizantes, es decir, aquellos que inhiben la actividad biológica de los polipéptidos de la sustancia, son especialmente preferidos para diagnóstico y terapia.

[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

Se se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un polipéptido inmunogénico que lleva un(os) epitopo(s) obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención. Dependiendo de la especie huésped, pueden utilizarse diversos coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos coadyuvantes incluyen, pero no están limitados a, geles minerales de Freund como hidróxido de aluminio y sustancias activas en superficie como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa cerradura y dinitrofenol. BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum* son coadyuvantes humanos potencialmente útiles que pueden emplearse si el polipéptido de la sustancia purificado se administra a individuos inmunológicamente comprometidos con el fin de estimular la defensa sistémica.

El suero del animal inmunizado se recoge y se trata según procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales hacia un epitopo obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención contiene anticuerpos hacia otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible]
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

por cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para producir y procesar los antisueros policlonales son conocidas en la técnica. Para poder preparar dichos anticuerpos, la invención proporciona también polipéptidos de la invención o fragmentos de éstos haptenizados por otro polipéptido para uso como inmunógenos en animales o humanos.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia epitopos obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención pueden producirse fácilmente por un experto en la técnica. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales por hibridomas es bien conocida. Pueden crearse líneas celulares de producción de anticuerpos inmortales por fusión celular, y también por otras técnicas como transformación directa de linfocitos B con DNA oncogénico, o transfección con virus Epstein-Barr. Pueden rastrearse los paneles de anticuerpos monoclonales producidos frente a epitopos de órbita para diversas propiedades, es decir, por afinidad de isotipo y epitopo.

Los anticuerpos monoclonales de la sustancia y/o agente identificado de la presente invención pueden prepararse utilizando cualquier técnica que proporcione la producción

375

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
MADRID
Teléf.

de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivos. Estas incluyen, pero no están limitadas a, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Koehler y Millstein (1975 Nature 256:495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., (1983) Immunol. Today 4:72, Cote et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030) y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc., pág. 77-96). Además, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", la separación de genes de anticuerpo de ratón de genes de anticuerpo humanos para obtener una molécula con especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas (Morrison et al. (1984) Prc. Natl, Acad. Sci. 81:6851-6855, Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608, Takeda et al (1985) Nature 314:452-454). Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena simple (patente de Estados Unidos nº 4.946.779) pueden adaptarse para producir los anticuerpos de cadena simple específicos de la sustancia.

Los anticuerpos, tanto monoclonales como poloclonales, que están dirigidos hacia epitopos obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención son particularmente útiles en diagnóstico, y aquellos que son neutralizantes son útiles en inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales, en particular, pueden utilizarse para excitar anticuerpos anti-idiotipo. Los anticuerpos anti-idiotipo son inmunoglobulinas que llevan una "imagen interna" de la sustancia y/o agente frente al que se desea protección.

Las técnicas para excitar anticuerpos anti-idiotipo son conocidas en la técnica. Estos anticuerpos anti-idiotipo pueden ser útiles también en terapia.

Los anticuerpos pueden producirse también por inducción de la producción in vivo de la población de linfocitos o por rastreo de genotecas de inmunoglobulinas recombinantes o paneles de reactivos de unión altamente específicos como se describen en Orlandi et al. (1989, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3822-3837) y Winter, G., y Millstein, C. (1991, Nature, 349:293-299).

También pueden generarse fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específica para la sustancia. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, pero no están limitados a, los fragmentos $F(ab')_2$ que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab que pueden generarse por reducción de los

MADRID

puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')$_2$. Como alternativa, pueden construirse genotecas de expresión de Fab para permitir una rápida y sencilla identificación de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse W.D., et al., (1989) Science 256:1275-128 1).

## SEÑALIZADORES

Puede utilizarse una amplia variedad de señalizadores en los procedimientos de ensayo (así como en los rastreos) de la presente invención, proporcionando los señalizadores preferidos señales convenientemente detectables (por ejemplo por espectroscopía). Como ejemplo, un gen señalizador puede codificar una enzima que cataliza una reacción que altera las propiedades de absorción de luz.

Ejemplos de moléculas señalizadoras incluyen pero no están limitadas a β-galactosidasa, invertasa, proteína verde fluorescente, luciferasa, cloramfenicol, acetiltransferasa, β-glucuronidasa, exo-glucanasa y glucoamilasa. Como alternativa, pueden incorporarse nucleótidos marcados radiactivamente o marcados fluorescentemente a copias nacientes que se identifican después cuando se unen a las sondas de oligonucleótidos.

...MADRID

En una realización preferida, la producción de la molécula de señalizador se mide por la actividad enzimática del producto del gen señalizador, como la β-galactosidasa.

Se conocen en la técnica una serie de protocolos para detectar y medir la expresión del objetivo, como utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos de la proteína. Los ejemplos incluyen ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas fluorescentes (FACS). Se prefiere un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales de dos sitios, que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos con dos epitopos no interferentes en polipéptidos, pero puede emplearse un ensayo de unión competitiva. Estos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, en Hampton R., et al. (1990), Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul MN) y Maddox D.E. e al., (1983 , J. Exp. Med. 15 8:121 1).

Se conocen una amplia variedad de marcajes y técnicas de conjugación por los expertos en la técnica y pueden utilizarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir hibridación marcada de sondas PCR para detectar las secuencias del polinucleótidos objetivo incluyen el oligomarcaje,

MORENO
MADRID

traducción de muescas, marcaje terminal o amplificación por PCR utilizando un oligonucleótido marcado. Como alternativa, la secuencia de codificación, o cualquier porción de ella, puede clonarse en un vector para la producción de una sonda de mRNA. Dichos vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles y pueden utilizarse para sintetizar sondas de RNA in vitro por adición de una polimerasa de RNA apropiada como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados.

Una serie de compañías como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp. (Cleveland, OH) suministran estuches comerciales y protocolos para estos procedimientos. Las moléculas señalizadoras o marcadoras adecuadas incluyen agentes de radionucleidos, de enzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que explican el uso de dichos marcadores incluyen los documentos US-A-3817837, US-A-3850752, US-A-3939350, US-A-3996345, US-A-4277437, US-A-4275149 y US-A-4366241. Además, las inmunoglobulinas recombinantes pueden producirse como se muestra en el documento US-A-4816567.

Los procedimientos adicionales para cuantificar la

AN
113
ADRID

expresión de una molécula particular incluyen marcaje radiactivo (Melby, P.C., et al. 1993, J. Immunol. Methods 159:235-44) o biotinación (Duplaa, C.et al., 1993, Anal. Biochem. 229-36) de nucleótidos, coamplificación de un ácido nucleico control y curvas estándares en las que se interpolan los resultados experimentales. La cuantificación de muestras múltiples puede acelerarse realizando en ensayo en formato ELISA, en el que el oligómero de interés se presenta a varias diluciones y una respuesta espectrofotométrica o calorimétrica proporciona una rápida cuantificación.

Aunque la presencia/ausencia de expresión de un gen marcador sugiere que el gen de interés está también presente, su presencia y expresión deben confirmarse. Por ejemplo, si la secuencia de nucléotidos se inserta en una secuencia de gen marcador, las células recombinantes que contienen el mismo pueden identificarse por la ausencia de función del gen marcador. Como alternativa, un gen marcador puede colocarse en tándem con una secuencia de codificación objetivo bajo el control de un promotor simple. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o selección indica habitualmente la expresión del objetivo también.

Como alternativa, las células huésped que contienen la secuencia de codificación para el objetivo y que expresan las regiones de codificación del objetivo pueden identificarse mediante una serie de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no están limitados a, hibridación DNA-DNA o DNA-RNA y técnica de bioensayo de proteínas o inmunoensayo, que incluyen tecnologías basadas en membrana, basadas en disoluciones o basadas en chips para la detección y/o cuantificación del ácido nucleico o proteína.

## ENSAYOS GENERALES DE LA ACTIVIDAD/NIVELES DE cAMP

Puede determinarse la capacidad de un agente de ensayo de potenciar el cAMP midiendo un aumento o reducción relevante de un nivel objetivo. Además, o como alternativa, puede determinarse la capacidad de un agente de ensayo de potenciar el cAMP midiendo un aumento relevante en los niveles de cAMP. Como ejemplo, pueden adaptarse las explicaciones de Smith et al., 1993 (Appl. Biochem. Biotechol., 41:189-218). Existen también estuches de inmunoensayo disponibles comercialmente para la medida del cAMP (por ejemplo Amersham International, Arlington Heights, IL y DuPont, Boston, MA). Se proporcionan los detalles de un ensayo de cAMP adecuado en la sección experimental.

RASTREOS

Puede utilizarse cualquiera de uno o más objetivos adecuados, como una seuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos, para identificar un $P_{cAMP}$ en cualquiera de una serie de técnicas de rastreo de medicamentos. El objetivo empleado en dicho ensayo puede estar libre en disolución, fijado a un soporte sólido, portado sobre una superficie celular o localizado intracelularmente. Puede medirse la anulación de la actividad del objetivo o la formación de complejos de unión entre el objetivo y el agente a ensayar.

Las técnicas de rastreo de medicamentos pueden basarse en el procedimiento descrito en Geysen, solicitud de patente europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. En resumen, se sintetiza un gran número de diferentes compuestos de ensayo peptídicos pequeños sobre un sustrato sólido, como puntas de plástico o alguna otra superficie. Se hacen reaccionar los compuestos peptídicos de ensayo con un objetivo adecuado o fragmento de éste y se lavan. Se detectan entonces las entidades unidas, como por procedimientos de adaptación adecuados bien conocidos en la técnica. También puede recubrirse directamente un objetivo purificado sobre placas para uso en técnicas de rastreo de medicamentos. Como alternativa, pueden utilizarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

Esta invención contempla también el uso de ensayos de rastreo de medicamentos competitivos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a un objetivo compiten específicamente con un compuesto de ensayo para la unión al objetivo.

Otra técnica de rastreo proporciona un rastreo de alto rendimiento (HTS) de agentes con afinidad de unión adecuada hacia las sustancias y está basado en el procedimiento descrito en el documento WO 84/03564.

Se espera que los procedimientos de ensayo de la presente invención sean adecuados para tanto rastreo a pequeña como a gran escala de compuestos de ensayo, así como en ensayos cuantitativos.

De esta manera, la presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian el cAMP, comprendiendo el procedimiento poner en contacto un objetivo adecuado con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de cAMP.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de identificar agentes que potencian selectivamente el cAMP en genitales sexuales femeninos, comprendiendo el procedimiento poner en contacto un objetivo adecuado de genitales sexuales femeninos con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de cAMP.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian el cAMP, comprendiendo el procedimiento poner en contacto un objetivo adecuado con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles del objetivo.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de identificar agentes que potencian selectivamente el cAMP en genitales sexuales femeninos, comprendiendo el procedimiento poner en contacto un objetivo adecuado de genitales sexuales femeninos con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles del objetivo.

En un aspecto preferido, el rastreo de la presente

MORENO
ALEMAN
113
MADRID

invención comprende al menos las siguientes etapas (que no tienen porqué estar en este mismo orden consecutivo): (a) realizar un rastreo in vitro para determinar si un agente candidato tiene la actividad relavante (como por modulación de PDEII y/o NEP, como NEP de riñón de perro), (b) realizar uno o más rastreos selectivos para determinar la selectividad del citado agente candidato (por ejemplo ver si el citado agente es también un inhibidor de ECA, como utilizando el protocolo de ensayo presentado en la presente) y (c) realizando un rastreo in vivo con el citado agente candidato (por ejemplo utilizando un modelo animal funcional). Típicamente, si el citado agente candidato pasa el rastreo (a) y el rastreo (b), se realiza el rastreo (c).

## DIAGNOSTICOS

La presente invención proporciona también una composición o estuche de diagnóstico para la detección de una predisposición al FSAD. A este respecto, la composición o estuche comprenderá una entidad que es capaz de indicar la presencia de uno o más, o incluso la ausencia de uno o más, de los objetivos en una muestra de ensayo. Preferiblemente, la muestra de ensayo se obtiene a partir de genitales sexuales femeninos o de una secreción de éstos.

MORENO
ALEMAN
113
MADRID
Telf.

Como ejemplo, la composición de diagnóstico puede comprender cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente o una variante, homólogo, fragmento o derivado de éstos, o una secuencia capaz de hibridarse con toda o parte de cualquiera de las secuencias de nucleótidos.

Para proporcionar una base para el diagnóstico de la enfermedad, deben establecerse valores patrón normales de un objetivo. Esto pueden conseguirse combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con un anticuerpo hacia un objetivo, en condiciones adecuadas para la formación de complejos, que son bien conocidas en la técnica. La cantidad de formación de complejo patrón puede cuantificarse por comparación con una serie de diluciones de controles positivos en que se combina una cantidad conocida de anticuerpo con concentraciones conocidas de un objetivo purificado. Después, los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por FSAD. La desviación entre los valores patrón y del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad.

Un objetivo mismo, o cualquier parte de él, puede

MORENO
113
MADRID

proporcionar la base para un compuesto de diagnóstico y/o terapéutico. Con fines de diagnóstico, las secuencias de polinucleótidos objetivo pueden utilizarse para detectar y cuantificar la expresión genética en estados, trastornos o enfermedades en las que pueda estar implicado el FSAD.

La secuencia de polinucleótidos que codifica el objetivo puede utilizarse para el diagnóstico del FSAD resultante de la expresión del objetivo. Por ejemplo, las secuencias de polinuclétidos que codifican un objetivo pueden utilizarse en ensayos de hibridación o PCR de biopsias o autopsias o fluidos biológicos, para detectar anormalidades en la expresión del objetivo. La forma de dichos procedimientos cuantitativos o cualitativos puede incluir análisis Southern o Northern, transferencia de puntos u otras tecnologías basadas en membrana, tecnologías PCR, varillas de sondeo, tecnologías de puntas o chips, y ELISA u otras tecnologías de formato de múltiples muestras. Todas estas técnicas son bien conocidas en la técnica y son de hecho la base de muchos estuches de diagnóstico comercialmente disponibles.

Dichos ensayos pueden ajustarse para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico particular y pueden utilizarse en estudios animales, en ensayos clínicos

113 MADRID

o para monitorizar el tratamiento de un paciente individual. Para proporcionar una base para el diagnóstico de una enfermedad debe establecerse un perfil normal o patrón para la expresión del objetivo. Esto se consigue combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con el objetivo o una porción de éste, en condiciones adecuadas para la hibridación o amplificación. La hibridación patrón puede cuantificarse por comparación de los valores obtenidos de sujetos normales con una serie de diluciones de controles positivos ensayados en el mismo experimento, en que se utiliza una cantidad conocida de objetivo purificado. Los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por un trastorno o enfermedad relacionado con la expresión de la secuencia de codificación del objetivo. La desviación entre los valores patrón y del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad. Si se establece la enfermedad, se administra un agente terapéutico existente y pueden generarse valores o perfiles de tratamiento. Finalmente, puede repetirse el ensayo regularmente para evaluar si los valores progresan o regresan al esquema normal o patrón. Los perfiles de tratamiento sucesivos pueden utilizarse para mostrar la eficacia del tratamiento durante un periodo de varios días o varios meses.

De esta manera, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido objetivo o variante, homólogo, fragmento o derivado de éste, para producir anticuerpos anti-objetivo que pueden, por ejemplo, utilizarse como diagnóstico para detectar y cuantificar los niveles de objetivo en estados de FSAD.

La presente invención proporciona también ensayos y estuches de diagnóstico para la detección de un objetivo en células y tejidos, que comprenden un objetivo purificado que puede utilizarse como control positivo, y anticuerpos anti-objetivo. Dichos anticuerpos pueden utilizarse en tecnologías basadas en disoluciones, basadas en membrana o basadas en tejidos para detectar cualquier estado de enfermedad o estado relacionado con la expresión de la proteína objetivo o expresión de las deleciones o una variante, homólogo, fragmento o derivado de éste.

## SONDAS

Otro aspecto de la invención en cuestión es la provisión de sondas de hibridación de ácidos nucleicos o PCR que son capaces de detectar secuencias de polinucleótidos,

MADRID

incluyendo secuencias genómicas, que codifican una región de codificación del objetivo o moléculas estrechamente relacionadas, como alelos. La especificidad del la sonda, es decir, si deriva de una región o dominio altamente conservado, conservado o no conservado, y el rigor de la hibridación o amplificación (alto, intermedio, bajo) determinarán si la sonda identifica sólo las secuencias de codificación del objetivo de origen natural, o secuencias relacionadas. Las sondas de detección de secuencias de ácidos nucleicos relacionados se seleccionan de regiones de nucléotidos conservadas o altamente conservadas de los miembros de la familia del objetivo y dichas sondas pueden utilizarse en un conjunto de sondas degeneradas. Para la detección de secuencias de ácidos nucleicos idénticas, o cuando se desea una máxima especificidad, las sondas de ácidos nucleicos se seleccionan de regiones de nucleótidos no conservadas o regiones únicas de los polinucleótidos objetivo. Como se utiliza en la presente, el término "región de nucleótidos no conservada" se refiere a un región de nucleótisos que es única en una secuencia de codificación de objetivo descrita en la presente y que no aparece en miembros de la familia relacionados.

La PCR, como se describre en los documentos US-A-4683195, US-A-4800195 y US-A-4965188, proporciona usos adicionales

[illegible] MADRID
Telef. 519 [illegible]

para los oligonucleótidos basados en secuencias objetivo. Dichos oligonucleótidos generalmente se sintetizan químicamente, pero pueden generarse enzimáticamente o producirse a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros comprenden generalmente dos secuencias de nucleótidos, una con orientación sentido (5'->3') y otra con antisentido (3'->5') empleadas en condiciones optimizadas para la identificación de un gen o estado específico. Los dos mismos oligómeros, conjuntos anidados de oligómeros, o incluso conjunto degenerado de oligómeros, pueden emplearse en condiciones menos rigurosas para la detección y/o cuantificación de secuencias de DNA o RNA estrechamente relacionadas.

La secuencia de ácidos nucleicos para un objetivo puede utilizarse también para generar sondas de hibridación, como se ha descrito anteriormente, para mapear la secuencia genómica endógena. La secuencia puede mapearse en un cromosoma particular o una región específica del cromosoma utilizando técnicas bien conocidas. Estas incluyen hibridación in situ a dispersiones cromosómicas (Verma et al. (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York City), preparaciones cromosómicas con clasificación de flujo o construcciones de cromosomas artificiales como YAC, cromosomas bacterianos artificiales

MORENO
LEMAN
13
MADRID
Telf

392 F

(BAC), construcciones bacterianas PI o genotecas de cDNA de cromosomas simples.

La hibridación in situ de preparaciones cromosómicas y las técnicas de mapeo físico, como el análisis de ligamiento utilizando marcadores cromosómicos establecidos, son inestimables en la extensión de los mapas genéticos. Pueden encontrarse ejemplos de mapas genéticos en Science (1995, 270:410 y siguientes y 1994, 265:1981 y siguientes). A menudo, la posición de un gen en un cromosoma de otra especie de mamífero puede revelar marcadores asociados incluso si el número o brazo de un cromosoma humano particular no es conocido. Pueden asignarse nuevas secuencias a los brazos cromosómicos, o partes de éstos, por mapeo físico. Esto proporciona información valiosa a los investigadores que buscan los genes de las enfermedades utilizando clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Una vez se ha localizado aproximadamente una enfermedad o síndrome por ligamiento genético a una región genómica particular, cualquier mapeo de secuencias de ese área puede representar genes asociados o regulatorios para investigaciones posteriores. La secuencia de nucleótidos objeto de la invención puede utilizarse también para detectar diferencias en la localización cromosómica debida a translocación, inversión,

[illegible] MORENO
[illegible] 13
[illegible]DRID

etc. entre individuos normales, portadores o afectados.

CELULAS HUESPED

El término "célula huésped" en relación con la presente invención incluye cualquier célula que podría comprender el objetivo del agente de la presente invención.

De esta manera, otra realización de la presente invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas con un polinucleótido que es o expresa el objetivo de la presente invención. Preferiblemente, el citado polinucleótido se lleva en un vector de replicación y expresión de los polinucleótidos que son el objetivo o expresan el objetivo. Las células elegirán para que sean compatibles con el citado vector y pueden ser por ejemplo células procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levadura o de plantas.

La bacteria gram-negativa *E. coli* se utiliza ampliamente como huésped para la expresión de genes heterólogos. Sin embargo, tienden a acumularse grandes cantidades de proteína heteróloga dentro de la célula. La purificación posterior de la proteína deseada de las proteínas intracelulares de *E. coli* en bruto puede ser difícil a

[illegible] MORENO
INGL [illegible]
[illegible] RID
Teléf. [illegible]

veces.

En contraposición con *E. coli*, las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como huéspedes heterólogos por su capacidad de segregar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como huéspedes son las de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención, y/o el deseo de un procesamiento posterior de la proteína expresada, pueden preferirse huéspedes eucarióticos como levaduras u otros hongos. En general, se prefieren las células de levadura sobre las células fúngicas porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas se segregan mal por las células de levadura, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo hiperglicosilación en levadura). En estos casos, debe seleccionarse un organismo huésped fúngico diferente.

Ejemplos de huéspedes de expresión adecuados dentro del alcance de la presente invención son hongos como la especie *Aspergillus* (como las descritas en el documento EP-A-0184438 y EP-A-0284603) y especie *Trichoderma*, bacterias como la especie *Bacillus* (como las descritas en los

MORENO
MADRID

395

documentos EP-A-0134048 y EP-A-0253455), la especie *Streptomyces* y especie *Pseudomonas* y levaduras como la especie *Kluyveromyces* (como las descritas en los documentos EP-A-0096430 y EP-A-0301670) y la especie *Saccharomyces*. Como ejemplo, los huéspedes de expresión típicos pueden seleccionarse de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger var. tubigensis*, *Aspergillus niger var. awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus orvzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

El uso de células huésped adecuadas, como células huésped de levaduras, hongos y plantas, puede proporcionar modificaciones post-transcripcionales (por ejemplo miristoilación, glicosilación, truncado, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) como puede ser necesario para conferir una actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinante de la presente invención.

## ORGANISMO

El término "organismo" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que podría comprender

[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

el objetivo según la presente invención y/o productos obtenidos de éste. Los ejemplos de organismos pueden incluir un hongo, levadura o planta.

El término "organismo transgénico" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprende el objetivo según la presente invención y/o los productos obtenidos.

## TRANSFORMACION DE CELULAS HUESPED/ORGANISMOS HUESPED

Como se indicó anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las explicaciones sobre la transformación de huéspedes procarióticos está bien documentada en la técnica, por ejemplo véase Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology 81995), John Wiley & Sons, Inc.

Si se utiliza un huésped procariótico, la secuencia de nucleótidos puede tener que ser modificada adecuadamente antes de la transformación, como por eliminación de

MORENO
LEMAN
113
MADRID

intrones.

En otra realización, el organismo transgénico puede ser una levadura. A este respecto, las levaduras también se han utilizado ampliamente como vehículo para la expresión de genes heterólogos. La especie *Saccharomyces cerevisiae* tiene una larga historia de uso industrial, incluyendo su uso para la expresión de genes heterólogos. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido revisada por Goodey et al (1987, Yeast Biotechnology, D.R. Berry et al., eds., pág. 401-429, Allen y Unwin, Londres) y por King, et al. (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E.F. Walton y G.T. Yarronton, eds., pág. 107-133, Blackie, Glasgow).

Por varias razones, *Saccharomyces cerevisiae* es adecuada para la expresión de genes heterólogos. En primer lugar, no es patogénica para humanos y es incapaz de producir ciertas endotoxinas. En segundo lugar, tiene una larga historia de uso seguro durante siglos de explotación comercial con varios fines. Esto ha llevado a una amplia aceptación del público. En tercer lugar, el uso comercial e investigación dedicadas al organismo ha dado como resultado una riqueza de conocimientos sobre su genética y fisiología así como sobre las características de

MADRID

fermentación a gran escala de *Saccharomyces cerevisiae.*

Se proporciona una revisión de los principios de la expresión de genes heterólogos en Sacccharomyces cerevisiae y la secreción de productos genéticos en H. Hinchcliffe, E. Kenny (1993, "Yeast as a vehicule for the expression of heterologous genes", Yeasts, vol 5, Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, eds., 2ª edición, Academic Press Ltd.).

Están disponibles varios tipos de vectores de levaduras, incluyendo vectores integradores, que necesitan la recombinación con el genoma del huésped para su mantenimiento y replicación autónoma en vectores plásmidos.

Para preparar Saccharomyces transgénica, se preparan las estructuras de expresión por inserción de la secuencia de nucleótidos de la presente invención en una estructura diseñada para la expresión en levadura. Se han desarrollado varios tipos de estructuras utilizadas para la expresión heteróloga. Las estructuras contienen un promotor activo en levadura condensado a la secuencia de nucleótidos de la presente invención, habitualmente se utiliza un promotor de origen de levadura, como el promotor GAL1. Habitualmente se utiliza una secuencia señal de origen de levadura, como la secuencia que codifica el péptido señal SUC2. Un

MORENO
MAN
13
MADRID
Tel.

terminador activo en levadura termina el sistema de expresión.

Para la transformación de levaduras se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, puede prepararse una Saccharomyces transgénica según la presente invención siguiendo las expliaciones de Hinnen et al. (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929), Beggs, J.D. (1978, Nature, Londres, 275, 104) e Ito, H. et al. (1983, J. Bacteriology 153, 163-168).

Las células de levadura transformadas se seleccionan utilizando diversos marcadores selectivos. Entre los marcadores utilizados para la transformación existe una serie de marcadores auxotróficos como LEU2, HIS4 y TRP1, y marcadores de resistencia a antibióticos dominantes como marcadores del antibiótico aminoglicósido, por ejemplo G418.

Otro organismo huésped es una planta. El principio básico en la construcción de plantas genéticamente modificadas es insertar información genética en el genoma de la planta de modo que se obtenga un mantenimiento estable del material genético insertado. Existen algunas técnicas para la inserción de información genética, siendo las dos

PATRICIA MORENO
INGLÉS
nº 113
MADRID
Teléf.

principales la introducción directa de la información genética y la introducción de la información genetica mediante el uso de un sistema de vector. Puede encontrarse una revisión de las técnicas generales en artículos de Potrykus (Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech Marzo/abril 1994 17-27). Pueden encontrarse otras explicaciones sobre transformación de plantas en el documento EP-A-0449375.

De esta manera, la presente invención proporciona también un procedimiento de transformación de una célula huésped con una secuencia de nucleótidos que debe ser el objetivo o expresar el objetivo. Las células huésped transformadas con la secuencia de nucleótidos pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede segregarse o puede contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector utilizado. Como comprenderán los expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirijan las secreción de las secuencias de codificación a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular. Otras estructuras

[illegible] RID
Teléf. [illegible]

recombinantes pueden unir la secuencia de codificación a la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de las proteínas solubles (Kroll D.J. et al, (1993), DNA Cell. Biol. 12:441-53).

COMPOSICIONES FARMACEUTICAS

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo combinaciones de éstos).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria y comprenderá típicamente uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos o diluyentes para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen en, por ejemplo Pharmaceutical Sciences de Remington, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit., 1985). La selección del vehículo, excipiente o diluyente puede hacerse con respecto a la ruta pretendida de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmaceúticas pueden comprender como, o

PATRICIA MORENO
MADRID

además de, vehículo, excipiente o diluyente, cualquier ligante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento o agente(s) de solubilización.

Pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, tintes y agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido para-hidroxibenzoico. También pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión.

Puede haber diferentes requerimientos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de suministro. Como ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para suministrarse utilizando una minibomba o por vía mucosa, por ejemplo en forma de un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o disolución ingerible, o parenteralmente, en la que la composición se formula en una forma inyectable para suministro, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Como alternativa, la formulación puede diseñarse para ser suministrada por ambas vías.

Cuando el agente se va a suministrar por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debería ser capaz de

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS Y [illegible]
C. [illegible]
Teléf. [illegible] MADRID

permancer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal, por ejemplo debería ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detergentes de la bilis.

Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inhalación, en forma de un supositorio o pesario, tópicamente en forma de una loción, disolución, crema, ungüento o polvo, utilizando un parche dérmico, oralmente en forma de comprimidos que contienen excipientes como almidón o lactosa, o en cápsulas y óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, disoluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse preferiblemente en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o monosacáridos suficientes para hacer la disolución isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o grageas que pueden formularse de manera convencional.

PATENTIA NOEL MORENO
MADRID

404

Preferiblemente, el agente está en una forma que es adecuada para suministro oral.

Para algunas realizaciones el agente preferiblemente no actúa, cuando se utiliza, sobre el sistema nervioso central.

En algunas realizaciones el agente es preferiblemente, cuando se utiliza, de acción periférica.

## ADMINISTRACION

Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, peso, y respuesta del paciente particular. Las dosificaciones a continuaciuón son ejemplares del caso medio. Puede haber casos, por supuesto, en que sean necesarios intervalos de dosificación mayores o menores.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por inyección directa. La composición puede formularse para administración parenteral, mucosa, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular o transdérmica. Dependiendo de la necesidad, el agente puede administrarse a una dosis desde 0,01 a 30 mg/kg de peso

PATRICIA [illegible]
INGLES Y ALEMAN
[illegible] 113
MADRID

corporal, como de 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

El término "administrado" incluye el suministro por técnicas víricas o no víricas. Los mecanismos de suministro vírico incluyen pero no están limitados a vectores adrenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores víricos de herpes, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos y vectores baculovíricos. Los mecanismos de suministro no vírico incluyen transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, anfífilos faciales catiónicos (CFA) y combinaciones de éstos. Las vías para dichos mecanismos de suministro incluyen, pero no están limitadas a, vías mucosa, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, tópica o sublingual.

El término "administrado" incluye, pero no está limitado a, suministro por vía mucosa, por ejemplo en forma de un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o en forma de una disolución ingerible, por vía parenteral en la que el suministro es por medio de una forma inyectable, como por ejemplo, por vía intravenosa, intramusculr o subcutánea.

Para algunas aplicaciones se agente se administra preferiblemente de forma oral.

406

Para algunas aplicaciones se agente se administra preferiblemente de forma tópica.

MODELOS DE ENSAYO ANIMAL

Pueden utilizarse modelos in vivo para investigar y/o diseñar terapias o agentes terapéuticos para tratar FSAD. Los modelos podrían utilizarse para investigar el efecto de diversas herramientas/compuestos líder sobre una serie de parámetros que indican la respuesta de excitación sexual.

Existe una serie de modelos animales para la disfunción sexual femenina vasculogénica (FSAD) disponibles que pueden utilizarse.

Como ejemplo, puede hacerse referencia a modelos animales invasivos (por ejemplo véase Park et al., 1997). En este caso, las respuestas hemodinámicas vaginal y clitórica pueden registrarse directamente a continuación de la estimulación del nervio pélvico en conejos hembras normales y ateroscleróticos (un modelo validado de FSAD). Los efectos in vivo de los potenciadores de cAMP, como agentes vasodilatadores como antagonistas NPY o agonistas VIP,

PATRICIA ... INGLÉS ... MADRID

pueden investigarse en animales normales o FSAD.

Como otro ejemplo, puede hacerse referencia a modelos animales no invasivos (por ejemplo véase la revisión de Goldstein et al., 1998, Laan et al., 1998). En este caso, la ultrasonografía de onda Doppler por pulsos proporciona el medio para detectar los cambios de flujo sanguíneo en las arterias vaginal y clitórica. Este modelo puede utilizarse para investigar los efectos vasculogénicos durante la administración de vasodilatadores.

Otras técnicas no invasivas que pueden utilizarse incluyen fotopletismografía vaginal, que proporciona una medida cuantitativa de la congestión de la mucosa vaginal, y técnicas de eliminación térmica vaginal, que están basadas en el principio de que los cambios en el flujo sanguíneo vaginal pueden registrarse midiendo la transferencia de calor de una sonda intravaginal mantenida a temperatura constante.

En un aspecto preferido, se utiliza un modelo no invasivo de FSAD.

## UN MODELO ANIMAL DE EXCITACION SEXUAL

En nuestros estudios, hemos desarrollado un modelo reproducible y robusto de la fisiología de la excitación sexual. Este modelo utiliza un conejo anestesiado y emplea tecnologías de láser Doppler para monitorizar el flujo sanguíneo genital registrando rutinariamente los parámetros cardiovasculares. Somos capaces de medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo vaginal inducido por la estimulación del nervio pélvico o por infusión de VIP en ausencia y en presencia de agentes de ensayo.

Creemos que nuestro modelo animal refleja directamente los datos clínicos. Por ello, este modelo puede utilizarse para estudiar agentes candidatos para el tratamiento de FSAD, como para medir la estimulación del flujo sanguíneo vaginal.

## MEDIDA FISIOLOGICA DE LA EXCITACION SEXUAL FEMENINA

Según la presente invención, pueden utilizarse una serie de técnicas diferentes para medir el flujo sanguíneo clitórico y vaginal. Como ejemplo, puede hacerse uso de fotopletismografía vaginal, técnica de lavado del calor vaginal, MRI vaginal y clitórico de contraste mejorado,

[illegible] ALEMAN [illegible] 113 [illegible] MADRID

imágenes clitóricas/vulvares por pulsos de láser Doppler y ultrasonografía clitórica.

La cuantificación de la lubricación vaginal puede medirse también por técnicas conocidas en la técnica, como (a) pesadas pre- y post-estimulación de tampones vaginales, y (b) medida del pH del fluido vaginal. Con respecto al último aspecto, el medio ácido normal en reposo en la vagina se hace más alcalino al acercarse al pH de la sangre cuando aparece la trasudación de fluido durante la estimulación sexual.

## PDE (fosfodiesterasa)

Según un aspecto de la presente invención, un objetivo $P_{cAMP}$ es una PDE (fosfodiesterasa).

Se sabe que los nucleótidos cíclicos, como cAMP y cGMP, son importantes segundos mensajeros intracelulares. Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, también conocidas como PDE, son una familia de enzimas que catalizan la degradación de nucleótidos cíclicos y, al hacerlo, son uno de los componentes celulares que regulan la concentración de nucleótidos cíclicos.

PATRICIA [illegible] MORENO [illegible] RID

En años recientes, se han definido al menos siete enzimas PDE (como PDEI - PDEVII), así como muchos subtipos de estas enzimas, basándose en la afinidad de sustrato y los requerimientos de cofactores (Beavo, J.A. y Reifsnyder, D.H., Trends Pharmacol. Sci. 11:150 (1990), Beavo, J., en: Cyclic Nucleotides Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action, Beavo, J. y Housley, M.D. (Eds.) Wiley:Chichester, pág. 3-15 (1990).

Ejemplos de PDE incluyen: PDEI que es una PDE dependiente de $Ca^{2+}$/calmodulina, PDEII que es una PDE estimulada por cAMP y cGMP, PDEIII que es una PDE inhibida por cGMP, PDEIV que es una PDE de alta afinidad específica por cAMP y PDEV que es una PDE específica de cGMP. Las PDEI y demás se denominan a veces PDE tipo I, y demás o PDE tipo 1, y demás.

Cada familia de PDE puede contener dos o más isoformas (es decir puede haber dos o más isoenzimas PDE). Como ejemplo, la PDEIV de mamífero, la homóloga del gen Dunce de *Drosophila* (Chen, C.N. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (EE.UU.) 83:9313 (1986)) se sabe que tiene cuatro isoformas en rata (Swinen J.V., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (EE.UU.) 86:5325 (1989)). Se sabe también que las PDE humanas aparecen como isoformas y tienen variantes de

PATRICIA KRAH MORENO
ALEMAN
113
MADRID

conexión. Por ejemplo, se informó de la clonación de una isoforma humana de PDEIV de monocitos en 1990 (Livi G.P. et al., Mol. Cell. Bio., 10:2678 [1990]). Como otro ejemplo, otros investigadores han clonado independientemente tres variantes de conexión de PDEIV, que se designan ahora como hPDEIV-B1, hPDEIV-B2 y hPDEIV-B3.

Las explicaciones sobre fosfodiesterasas pueden encontrarse también en los documentos UA-A-5932423 y US-A-5932465.

Las explicaciones sobre otras fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, es decir CN PCDE8, pueden encontrarse en el documento WO-A-97/35989. Según el documento WO-A-97/35989, la CN PCDE8 tiene dos isoenzimas, que se designaron CN PCDE8A y CN PCDE8B. El término "isoenzima" se refiere a veces en la técnica como "isoforma".

Según el documento WO-A-97/35989, se han identificado muchos inhibidores de diferentes PDE y algunos han experimentado evaluación clínica. Por ejemplo, los inhibidores de PDEIII se están desarrollando como agentes antitrombóticos, como agentes hipertensivos y como agentes cardiotónicos útiles en el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva. Se ha utilizado Rolipram, un inhibidor de PDEIII, en el tratamiento de la depresión y otros inhibidores de PDEIII están experimentando evaluación como agentes antiinflamatorios. Se ha mostrado que el Rolipram inhibe la TNF-alfa inducida por lipopolisacárido (LPS), que se ha mostrado que estimula la replicación de VIH-2 in vitro. Por lo tanto, rolipram puede inhibir la replicación de VIH-1 (Angel et al., 1995, AIDS 9:1137-44). Además, basándose en su capacidad de suprimir la producción de TNF alfa y beta y del interferón gamma, rolipram se ha mostrado eficaz en el tratamiento de encefalomielitis, el modelo animal experimental de esclerosis múltiple (Sommer et al., 1995, Nat. Med. 1:244-248) y puede ser eficaz en el tratamiento de disquinesia tardía (Sasaki et al., 1995, Eur. J. Pharmacol. 282:71-76).

Según el documento WO-A-97/35989, existen también inhibidores de PDE no específicos, como teofilina, utilizada en el tratamiento del asma bronquial y otras enfermedades respiratorias, y pentoxifilina, utilizada en el tratamiento de claudicación intermitente y enfermedades vasculares periféricas inducidas por la diabetes. La teofilina se cree que actúa sobre la función del músculo liso de las vías aéreas así como en una capacidad antiinflamatoria o inmunomoduladora en el tratamiento de enfermedades respiratorias (Banner et al, 1995, Respir. J. 8:996-1000) donde se cree que actúa inhibiendo la

PATRICIA ... MORENO
... MADRID

hidrólisis tanto de cAMP como de cGMP de CN PDE (Banner et al., 1995, Monaldi Arch. Chest. Dis. 50:286-292). La pentoxifilina, también conocida por bloquear la producción de TNF-alfa, puede inhibir la replicación de VIH-1 (Angel et al, supra). Se da una lista de inhibidores de CN PDE en Beavo, 1995, supra.

Se ha sugerido que los inhibidores selectivos de PDE, además de sus isoenzimas y sus isotipoas, conducirán a una terapia más eficaz con menos efectos secundarios. Por ejemplo, véanse las explicaciones de las revisiones de Wieshaar R.E., et al., (J. Med. Chem., 28:537[1985]), Giembycz M.A., (Biochem. Pharm., 43:2041 [1992]) y Lowe J.A. y Cheng J.B. (Drugs of the Future, 17:799-807 [1992]).

De esta manera, para algunas aplicaciones es deseable tener una inhibición selectiva de un tipo individual de PDE.

Las explicaciones de los antecedentes sobre las PDE han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a PDE2 o PDE estimulada por cGMP se ha extraído de esa fuente.

"Los nucleótidos cíclicos funcionan como segundos

MORENO
MADRID

mensajeros que median una serie de respuestas celulares ante señales extracelulares como hormonas, luz y neurotransmisores. Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE) juegan un papel en la transducción de la señal por regulación de las concentraciones celulares de los nucleótidos cíclicos. Las células de mamíferos contienen múltiples PDE que se distinguen en al menos 7 familias basadas en su afinidad de sustrato y en su sensibilidad selectiva hacia cofactores y medicamentos inhibidores. Estas familias son: (I) PDE dependientes de $Ca^{2+}$/calmodulina, (II) PDE estimuladas por cGMP, (III) PDE inhibidas por cGMP, (IV) PDE específicas de cAMP, (V) PDE específicas de cGMP, (VI) PDE fotoreceptoras y (VII) PDE de alta afinidad específicas de cAMP. A partir de la secuencia de aminoácidos, es evidente que todas estas familias de PDE contienen un dominio relacionado, que se piensa que es el dominio catalítico, con aproximadamente un 30% de identidad de secuencia entre las familias. Los miembros de la misma familia están relacionados más estrechamente, comparten el 60-80% de la identidad de secuencia a lo largo de toda la región de codificación.

Michaeli et al. (1993) establecieron un rastreo

MORENO
MADRID

funcional altamente sensible para el aislamiento de cDNA que codifica fosfodiesterasas de cAMP por complementación de los defectos en la cepa Saccharomyces cerevisiae que carece de ambos genes de PDE de cAMP endógenos, PDE1 y PDE2. Se aislaron tres grupos de cDNA correspondientes a 3 genes humanos distintos que codificaban PDE específicas de cAMP a partir de una genoteca de cDNA de glioblastoma humano utilizando este rastreo funcional. Dos de los genes estaban estrechamente relacionados con la PDE específica de cAMP "dunce" de Drosophila. El tercer gen, al que Michaeli et al. (1993) se refirieron como HCP1, codificaba una nueva PDE específica de cAMP. HCP1 tenía una secuencia de aminoácidos relacionada con las secuencias de los dominios catalíticos de todas las PDE de nucleótidos cíclicos. Es una PDE de alta afinidad específica de cAMP que no comparte otras propiedades de la familia de PDE específicas de cAMP, sin embargo. La actividad PDE de HCP1 no era sensible a cGMP u otros inhibidores de las PDE inhibibles por cGMP. Las propiedades bioquímicas y farmacológicas de HCP1 sugirieron a Michaeli et al. (1993) que era un miembro de una familia de PDE de nucleótidos ciclicos no descubierta anteriormente, que se designó como la familia VII. Los análisis de

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] 113
MADRID

transferencia Northern indicaron la presencia de altos niveles de RNA de HCP1 en músculo esquelético humano.

Por análisis de transferencia Southern de líneas celulares híbridas, Millatovich et al. (1994) mapearon el locus de HCP1 en el cromosoma 8, por estudio de las líneas celulares híbridas que contenían diferentes regiones del cromosoma 8, regionalizaron la asignación de 8q13-q22. Han et al. (1998) mapearon el gen PDE7A en 8a13 por hibridación de fluorescencia in situ. Por análisis retrocruzado interespecífico, mapearon el gen Pde7A de ratón en la región proximal del cromosoma 3."

Las explicaciones de los antecedentes sobre PDE2 han sido presentadas por Jennifer P. Macke en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a PDE2 estimulada por cGMP se ha extraido de esa fuente.

"Rosman et al. (1997) clonaron un cDNA correspondiente a PDE2A humana. El gen de PDE2A codifica un polipéptido de 941 aminoácidos con una masa molecular predicha de 106 kD. La secuencia de proteína es un 90% idéntica a las secuencias de PDE2A

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible]
MADRID

bovina y de rata. El análisis de transferencia Western mostró que el PDE2A se expresaba como un mRNA de 4,2 kb a niveles variables en todos los tejidos humanos ensayados, con la gran excepción del cerebro. Los estudios de expresión revelaron que PDE2A hidroliza cAMP y cGMP y es inhibida por el inhibidor EHNA específico de PDE2A."

Las secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de las PDE están disponibles en la literatura. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En un aspecto, el objetivo PDE se selecciona de una o más de las siguientes enzimas PDE: $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ 1, $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ 2, $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ 3, $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ 4, $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ 7 y $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ 8.

En un aspecto más preferido, el objetivo PDE se selecciona de una o más de las siguientes enzimas PDE: $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ 1, $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ 2, $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ 3 y $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ 4.

Preferiblemente, para la presente invención, la PDE objetivo es al menos PDE2.

I:PDE

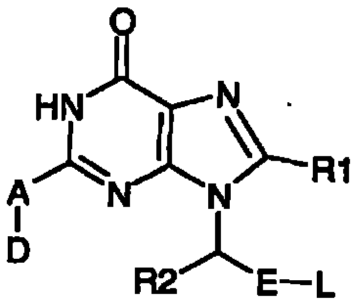
Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:PDE.

Ejemplos de I:PDE se describen en los documentos EP-A-091133 y EP-A-0771799.

Preferiblemente, el I:PDE es un I:PDE2. Así, los ejemplos de compuestos preferidos son los presentados en el documento EP-A-0771799.

Por conveniencia, la reivindicación 1 del documento EP-A-0771799 se repite ahora:

Un derivado de puri-6-ona de fórmula general (I):



en la que

MORENO
AN
13
MADRID

| | |
|---|---|
| $R^1$ | representa hidrógeno o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono, |
| $R^2$ | representa un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono opcionalmente sustituido con hidroxilo, azido o un grupo de fórmula $-NR^3R^4$ o $-OSO_2R^5$, en la que |
| $R^3$ y $R^4$ | son idénticos o diferentes y representan un cicloalquilo que contiene de 3 a 6 átomos de carbono, hidrógeno, formilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con un alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado, conteniendo respectivamente hasta 6 átomos de carbono o por un grupo de fórmula $-(CO)_a-NR^6R^7$, en la que |
| a | es el número 0 o 1, |
| $R^6$ y $R^7$ | son idénticos o diferentes y representan hidrógeno, formilo, hidroxilo, fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con hidroxilo o un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de |

[illegible] MORENO [illegible]

carbono, o

$R^3$ y/o $R^4$ representan un alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, carboxilo o un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido con hidroxilo o un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, o

$R^3$ y/o $R^4$ representan un residuo de fórmula $-(CO)_b-T-NR^8R^9$, $-CO-R^{10}$, $-SO_2R^{11}$ o $-SO_2NR^{12}R^{13}$, en el que

b tiene el significado dado anteriormente para a y es idéntico a éste o diferente de éste.

T puede representar un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, o cuando b no es 0, puede representar también un enlace,

$R^8$ y $R^9$ tienen el significado dado para los $R^6$ y $R^7$ anteriores y son idénticos a éstos o diferentes de éstos,

$R^{10}$ representa un heterociclo saturado, parcialmente saturado o insaturado de 5 a 7 miembros que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, que también puede estar opcionalmente

MORENO
ALEMAN
13
MADRID

sustituido en la función N con un alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, carboxilo, benciloxicarboxilo o hidroxilo,

$R^{11}$ representa un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, bencilo o fenilo,

$R^{12}$ y $R^{13}$ son idénticos o diferentes y representan hidrógeno, fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, o

$R^3$ y $R^4$ junto con el átomo de nitrógeno forman un heterociclo saturado, parcialmente saturado o insaturado de 5 o 6 miembros que puede contener hasta 3 heteroátomos seleccionados de N, S y/o O o un residuo $-NR^{14}$, y que está opcionalmente sustituido con carbonilo, un alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono que a su vez puede estar sustituido con hidroxilo, carboxi o un acilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que

MORENO
RID

contienen respectivamente hasta 6 átomos de carbono, en la que

$R^{14}$ representa hidrógeno, carbonilo o un alquilo o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 5 átomos de carbono, y

$R^{5}$ representa fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono,

A representa una cadena alquileno o alquenileno lineal o ramificada que contiene respectivamente hasta 6 átomos de carbono,

D y L son idénticos o diferentes y representan un arilo que contiene de 6 a 10 átomos de carbono o un heterociclo aromático de 5 a 7 miembros, opcionalmente benzocondensado, que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, opcionalmente sustituido hasta 3 veces, con el mismo o distinto halógeno, hidroxilo, nitro, trifluorometilo, carboxi, alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 6 átomos de carbono o por un grupo de fórmula $-(V)_{c}-$

MORENO [illegible] 113 MADRID

$NR^{15}R^{16}$ y/o $-OR^{17}$, en la que

c es el número 0 o 1,

V representa un residuo de fórmula -CO o $-SO_2$,

$R^{15}$ y $R^{16}$ son idénticos o diferentes y tienen el significado dado para $R^3$ y $R^4$ anteriormente,

$R^{17}$ representa hidrógeno, un alquenilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono, opcionalmente sustituido hasta 3 veces con el mismo o distinto hidroxilo, carbonilo o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, y/o los ciclos están opcionalmente sustituidos con un arilo que contiene de 6 a 10 átomos de carbono o con un heterociclo aromático de 5 a 7 miembros, opcionalmente benzocondensado, que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, que está a su vez opcionalmente sustituido hasta dos veces con el mismo o distinto halógeno, hidroxilo, nitro, carboxilo, trifluorometilo o un alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que

[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible]ADRID

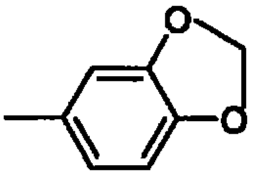
424

| | |
|---|---|
| | contiene respectivamente hasta 5 átomos de carbono o por un grupo de fórmula $(V')_d$-$NR^{18}R^{19}$, en la que |
| d | tiene el significado dado anteriormente para a y es idéntico a éste o diferente de éste, |
| $R^{18}$ y $R^{19}$ | tienen el significado dado anteriormente para $R^3$ y $R^4$ y son idénticos a éstos o diferentes de éstos, |
| V' | tiene el significado dado anteriormente para V y es idéntico a éste o diferente de éste, y/o |
| | representa el sistema de anillo dado a continuación para D, opcionalmente sustituido con un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con hidroxilo, un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono o por un grupo de fórmula $-NR^{20}R^{21}$, en la que |
| $R^{20}$ y $R^{21}$ | son idénticos o diferentes y tienen el significado dado anteriormente para $R^3$ y $R^4$, |
| | o |
| E | representa un residuo de fórmula $-CH_2$-Y-Z, en la que |

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. [illegible] - MADRID

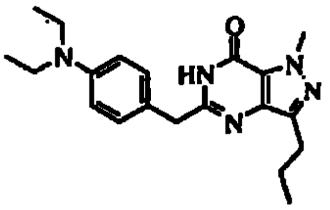
·425

| | |
|---|---|
| Y | representa un enlace o un átomo de oxígeno o azufre o el grupo -NH-, |
| Z | representa una cadena alquilo lineal o ramificada que contiene hasta 5 átomos de carbono, |
| D | representa un residuo de fórmula |

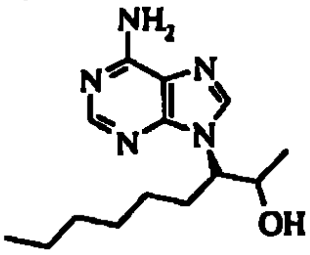
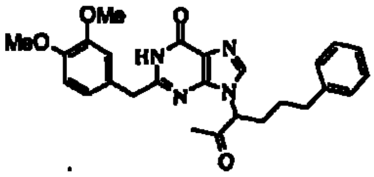
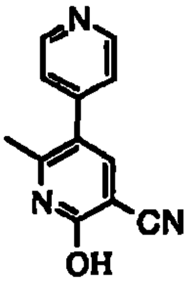


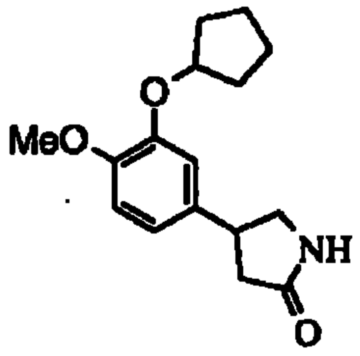
y tautómeros y sales de éste.

Los I:PDE preferidos se seleccionan de las siguientes estructuras:

| **Compuesto** | **Estructura** | **Modo de acción**<br>**Referencias** |
|---|---|---|
| FIa |  | I:PDEI<br>EP-A-091133<br>(ejemplo 50) |

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID
Telf.

| | | |
|---|---|---|
| FIb |  | I:PDE2<br>EHNA (también un inhibidor de adenosindesaminasa) |
| FII |  | I:PDE2<br>EP-A-0771799<br>(ejemplo 100) |
| FIII |  | I:PDE3<br>Milrinona<br>(que está comercialmente disponible) |

| | | |
|---|---|---|
| FIV |  | I:PDE4<br>Rolipram<br>(que está comercialmente disponible) |

NEP (endopeptidasa neutra)

Según un aspecto de la presente invención, un objetivo $P_{cAMP}$ es NEP.

Las secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de NEP están disponibles en la literatura. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En un aspecto, NEP es NEP (EC 3.4.24.11) (también conocida como encefalinasa o endopeptidasa-2). En este caso, hemos encontrado mRNA de NEP EC 3.4.24.11 y proteína expresada en vagina humana y de conejo.

En este caso, creemos que en las hembras, incluyendo las

que sufren FSAD, se degrada el VIP por NEP EC3.4.24.11. De esta manera, los inhibidores de NEP potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del VIP liberado durante la excitación. Esto conducirá a un tratamiento de FSAD, como por medio de un aumento de la congestión vaginal. Hemos mostrado que los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 estimulan los aumentos en el flujo sanguíneo genital vaginal estimulado por el nervio pélvico e inducidos por VIP. Además, esos inhibidores selectivos de NEP estimulan la relajación mediada por VIP y por los nervios de la pared vaginal aislada.

Las explicaciones de los antecedentes de NEP han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a NEP se ha extraído de esa fuente.

> "El antígeno de la leucemia linfocítica aguda común es un marcador de superficie celular importante en el diagnóstico de leucemia linfocítica aguda humana (ALL). Está presente en células leucémicas de fenotipo pre-B, que representan el 85% de los casos de ALL. CALLA no está restringido sin embargo a las células leucémicas, y se encuentra en una serie de

tejidos normales. CALLA es una glicoproteína que es particularmente abundante en riñón, donde se presenta en el borde de cepillo de los túbulos proximales y en el epitelio glomerular. Letarte et el. (1988) clonaron un cDNA que codificaba CALLA y mostraron que la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de cDNA es idéntica a la de la endopeptidasa neutra humana asociada a membrana (NEP, EC 3.4.24.11), también conocida como encefalinasa. NEP corta los péptidos en el lado amino de los residuos hidrofóbicos e inactiva diversas hormonas peptídicas, incluyendo glucagón, encefalina, sustancia P, neurotensina, oxitocina y bradiquinina. Por análisis de transfección de cDNA, Shipp et al. (1989) confirmaron que CALLA es una endopeptidasa neutra funcional del tipo que se ha llamado anteriormente encefalinasa. Barker et al. (1989) demostraron que el gen CALLA, que codifica una glicoproteína transmembrana de tipo II de 100 kD, existe en una sola copia de más de 45 kD que no está redispuesta como CALLA de superficie celular que expresa malignidades. Se localizó el gen en el cromosoma humano 3 por estudio de los híbridos celulares somáticos e hibridación in situ regionalizada en la localización 3q21-q27. Tran-Paterson et al. (1989)

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

asignaron también el gen al cromosoma 3 por análisis de transferencia Southern de DNA de híbridos celulares somáticos humano-roedor. D'Adamio et al. (1989) demostraron que el gen CALLA abarca más de 80 kb y está compuesto por 24 exones".

I:NEP

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:NEP.

Los I:NEP se discuten en los siguientes artículos de revisión:

Pathol. Biol., 46(3), 1998, 191.
Curent Pharm. Design, 2(5), 1996, 443.
Biochem. Soc. Trans., 21(3), 1993, 678.
Handbook Exp. Pharmacol., 104/1, 1993, 547.
TiPS, 11, 1990, 245.
Pharmacol Rev., 45(1), 1993, 87.
Curr. Opin. Inves. Drugs, 2(11), 1993, 1175.
Antihypertens. Drugs, (1997), 113.
Chemtracts, (1997), 10(11), 804.
Zinc Metalloproteases Health Dis. (1996), 105.
Cardiovasc. Drug. Rev., (1996), 14(2), 166.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES [illegible] RID
Tel. [illegible]

Gen. Pharmacol., (1996), 27(4), 581.
Cardiovasc. Drug Rev., (1994), 12(4), 271.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., (1995), 22(1), 63.
Cardiovasc. Drug Rev., (1991), 9(3), 285.
Exp. Opin. Ther. Patents (1996), 6(11), 1147.

Se describen I:NEP en los siguientes documentos:

EP-509442A
US-192435
US-4929641
EP-599444B
US-884664
EP-544620A
US-798684
J. Med. Chem. 1993, 3821.
Circulation 1993, 88(4), 1.
EP-136883
JP-85136554
US-4722810
Curr. Pharm. Design, 1996, 2, 443.
EP-640594
J. Med. Chem. 1993, 36(1), 87.
EP-738711-A
JP-270957

PATRICIA [illegible] MORENO
ING
MADRID

CAS nº 115406-23-0
DE-19510566
DE-19638020
EP-830863
JP-98101565
EP-733642
WO9614293
JP-08245609
JP-96245609
WO9415908
JP05092948
WO-9309101
WO-9109840
EP-519738
EP-690070
J. Med. Chem. (1993), 36, 2420.
JP-95157459
Bioorg. Med. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65.

Los I:NEP preferidos se describen en los siguientes documentos:

EP-A-0274234
JP-88165353
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, 164, 58

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN

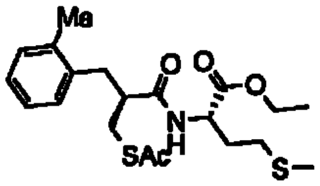
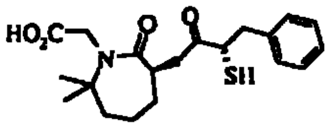
EP-629627-A

US-77978

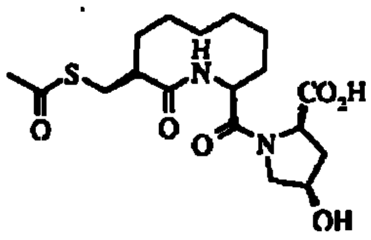
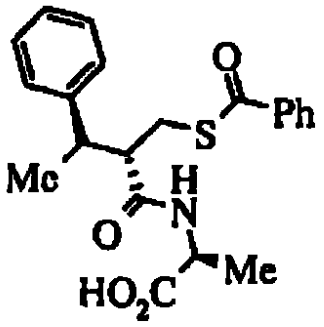
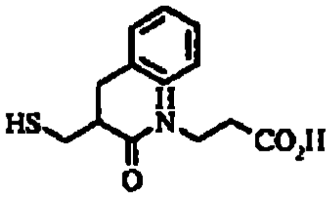
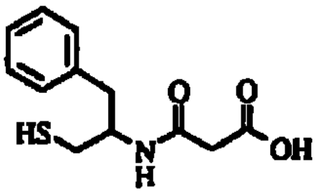
Perspect. Med. Chem. (1993), 45.

EP-358398-B

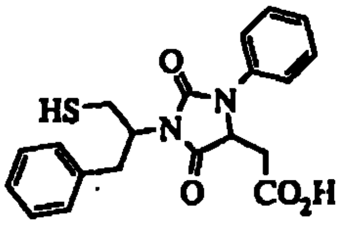
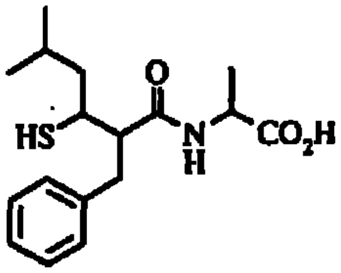
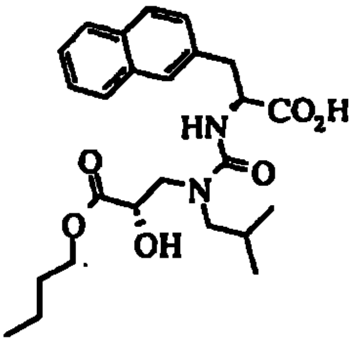
Los ejemplos preferidos de I:NEP se seleccionan de las siguientes estructuras:

| **Compuesto** | **Estructura** | **Modo de acción**<br>**Referencias** |
|---|---|---|
| FXII |  | I:NEP<br>EP-509442A<br>US-192435<br>US-4929641 |
| FXIII |  | I:NEP<br>(también inhibidor de ACE)<br>EP-599444B<br>US-884664 |

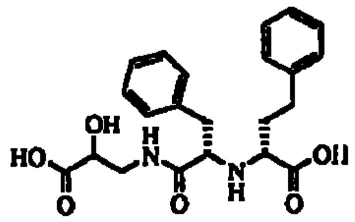
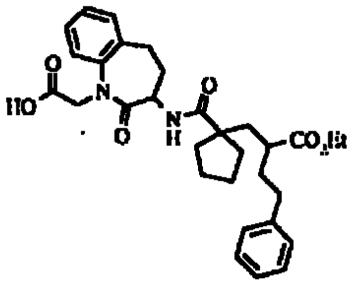
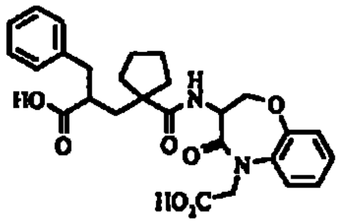
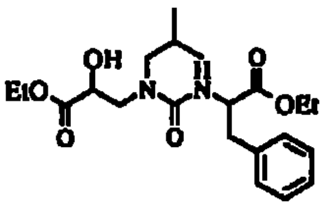
PATRICIA KOCH MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN

| | | |
|---|---|---|
| FXIV |  | I:NEP<br>EP-544620A<br>Us-798684<br>J. Med. Chem.<br>1993, 3821 |
| FXV |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>Mixanpril<br>Circulation 1993, 8(4), 1 |
| FXVI |  | I:NEP<br>EP-136883<br>JP-85136554<br>US-4722810 |
| FXVII |  | I:NEP<br>Retrothiorphan<br>Curr. Pharm.<br>Design, 1996, 2,<br>443. |

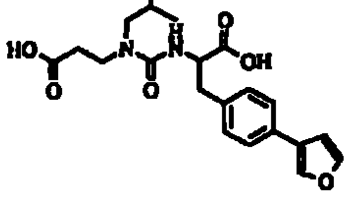
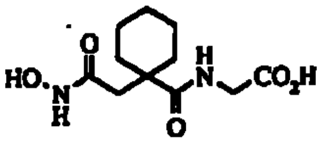
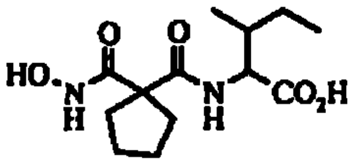
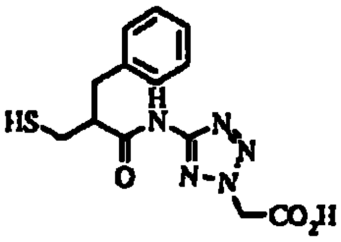
PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible]AN

| | | |
|---|---|---|
| FXVIII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>EP-640594 |
| FXIX |  | I:NEP<br>J. Med. Chem. 1993, 36(1), 87 |
| FXX |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>EP-738711-A<br>JP-270957 |

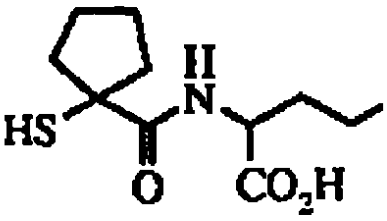
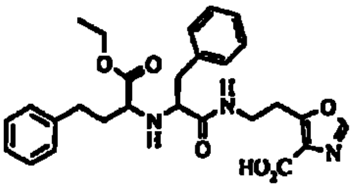
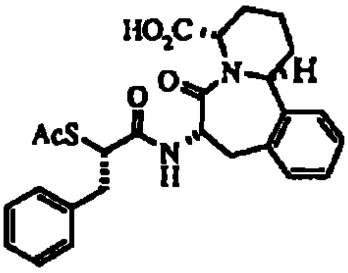
PATRICIA KOCH MORENO
Telf.

| | | |
|---|---|---|
| FXXI |  | I:NEP<br>n° CAS 115406-23-0 |
| FXXII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>DE-19510566<br>DE-19638020<br>EP-830863<br>JP-98101565 |
| FXXIII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>EP-733642 |
| FXXIV |  | I:NEP<br>WO96/14293 |

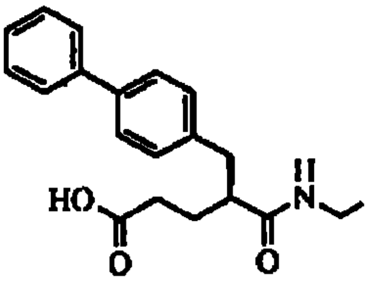
PATRICIA NOCH MORENO
INGLES ... JAN

| | | |
|---|---|---|
| FXXV |  | I:NEP<br>JP-08245609<br>JP-96245609 |
| FXXVI |  | I:NEP<br>WO9415908 |
| FXXVII |  | I:NEP<br>JP5092948 |
| FXXVIII |  | I:NEP<br>WO-9309101 |

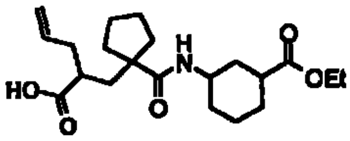
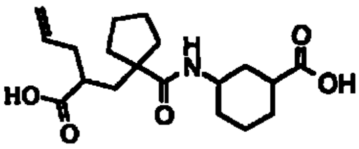
PATRICIA ... MORENO
INGLES ...
Tel.

| | | |
|---|---|---|
| FXXIX |  | I:NEP<br>WO-9109840 |
| FXXXI |  | I:NEP<br>EP-519738<br>EP-690070 |
| FXXXII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>J. Med. Chem.<br>(1993), 36, 2420. |

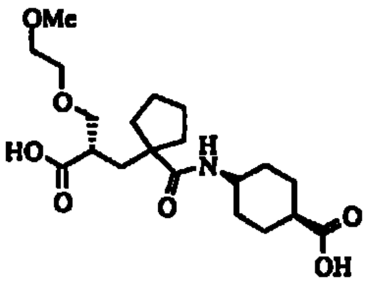
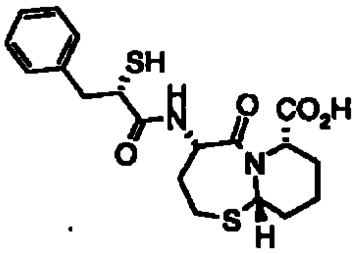
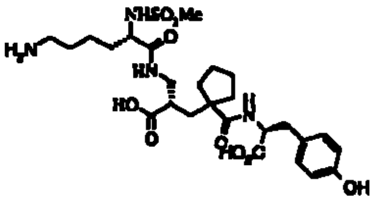
PATRICIA KOCH MORENO
ING...
...RID
c
Telf...

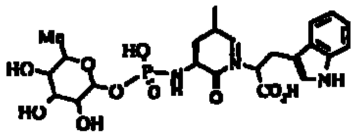
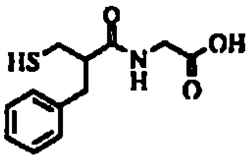
| | | |
|---|---|---|
| FXXXIII |  | I:NEP<br>JP-95157459<br>Bioorg. MEd. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65 |

Los I:NEP más preferidos se seleccionan de las siguientes estructuras:

| **Compuesto** | **Estructura** | **Modo de acción**<br>**Referencias** |
|---|---|---|
| FV |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(ejemplo 300) |
| FVI |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(ejemplo 379) |

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
MADRID

| | | |
|---|---|---|
| FVII |  | I:NEP<br>Candoxatrilat<br>EP-274234<br>JP-88165353<br>Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, 164, 58. |
| FVIII |  | I:NEP<br>Omapatrilat<br>(también un inhibidor de ACE)<br>EP-0629627-A<br>US-77978 |
| FIX |  | I:NEP<br>Sampatrilat<br>(también un inhibidor de ACE)<br>Perspect. Med. Chem. (1993), 45.<br>EP-0358398-B |

| | | |
|---|---|---|
| FX |  | I:NEP<br>Fosforamidón<br>(que está comercialmente disponible) |
| FXI |  | I:NEP<br>Tiorphan<br>(que está comercialmente disponible) |

NPY (neuropéptido Y)

Según un aspecto de la presente invención, un objetivo $P_{cAMP}$ es NPY o uno de sus receptores asociados.

Las secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de NPY y sus receptores están disponibles en la literatura. Algunas secuencias se presentan el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En este caso, hemos encontrado que el neuropéptido Y (NPY) ejerce una influencia regulatoria inhibidora sobre la vasorrelajación mediada por el péptido intestinal vasoactivo (VIP). De esta manera, la inhibición de los receptores NPY dará como resultado un aumento del flujo sanguíneo vaginal mediado por VIP y nervio pélvico, es decir, anular las barreras a la vasorrelajación. Clínicamente, esto conducirá a un aumento de la congestión vaginal que conducirá en último término a un aumento de la lubricación a través de trasudación de plasma y aumento de la flexibilidad vaginal. Por ello, un objetivo adecuado para el tratamiento de FSAD es NPY o uno de sus receptores asociados.

Así, en un aspecto preferido, el agente es un antagonista de NPY $Y_1$, $Y_2$ o $Y_5$, preferiblemente un antagonista oral de NPY $Y_1$, $Y_2$ o $Y_5$. Este agente tratará el FSAD aumentando el flujo sanguíneo vaginal y aumentando la lubricación.

El antagonismo mediado por NPY de los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo representa, por lo tanto, un objetivo terapéutico potencial mediante el cual el flujo sanguíneo en el tracto genital femenino puede ser influenciado. El mecanismo a través del cual aparece este antagonismo es muy probablemente a través de activación $G_{i/o}$ inducida por el receptor NPY $Y_1$. En otros sistemas fisiológicos, los receptores NPY $Y_1$ han sido implicados en la mediación de la vasoconstricción e inhibición de la

[illegible] Y [illegible] MADRID

liberación de transmisores simpáticos (Lundberg et al., 1996, no puede excluirse un efecto de NPY $Y_2$). Creemos que el NPY inhibe la vasorrelajación en el tracto genital femenino mediante la inhibición directa de la adenilato ciclasa que inhibie directamente la liberación de VIP o de neurotransmisión simpática.

Como se ha indicado, un objetivo $P_{cAMP}$ es uno de los receptores NPY.

La liberación neuronal de NPY regula la vasorrelajación inducida por VIP del lecho vascular vaginal. Esto ocurre muy probablemente a través de un mecanismo presináptico que implica a los receptores NPY $Y_1$, aunque no puede excluirse un modo de acción post-sináptico. Un antagonista de NPY potenciará la vasodilatación inducida por VIP del lecho vascular vaginal. Clinicamente, esto conducirá a un aumento de la lubricación y flexibilidad vaginal a través de la congestión de la pared vaginal.

Los estudios de expresión del receptor NPY realizados por nosotros han identificado los subtipos de receptor NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$ dentro de vagina humana.

Por ello, en un aspecto, el objetivo $P_{cAMP}$ es uno o más de

PAT[illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
[illegible], 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

los subtipos de receptores NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$.

Las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a NPY se ha extraído de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY) es un péptido abundante y ampliamente extendido en el sistema nervioso de los mamíferos. Muestra homología de secuencia con el péptido YY y por encima del 50% de homología en la secuencia de aminoácidos y secuencia de nucleótidos con el polipéptido pancreático (PNP, 167760). NPY es un péptido de 36 aminoácidos. Minth et al. (1984) clonaron el gen de NPY partiendo de mRNA de feocromocitoma. Takeuchi et al. (1985, 1986) aislaron clones de cDNA de los genes NPY y PNP a partir de un feocromocitoma y un tumor endocrino pancreático, respectivamente. Utilizando estas sondas de cDNA para analizar DNA genómico de paneles de asignación cromosómica de híbridos celulares somáticos humano-ratón, examinaron después la cuestión de si los genes son sinténicos. Los estudios no mostraron sintenia,

PATENTES [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMAN
[illegible]
MADRID

con NPY en 7pter-7q22 y PNP en 17p11.1-17qter. Por estudios de retrocruzamiento con Mus spretus, Bahary et al. (1991) mapearon el gen homólogo de NPY en el cromosoma 6 de ratón. Puesto que el cromosoma 6 tiene homología con el 7q humano, es probable que el gen NPY en humano esté localizado en la región 7cen-q22. Meisler et al. (1987) excluyeron ligamientos cercanos entre los loci de la fibrosis cística (219700) y el neuropéptido Y. Terenghi et àl. (1987) determinaron la distribución del mRNA que codifica NPY en neuronas de la corteza cerebral en especímenes de biopsia quirúrgica y cerebro postmortem por medio de técnicas de hibridación in situ. Mostraron una localización consistente de la transcripción y expresión del gen NPY en neuronas corticales maduras normales. Baker et al. (1995) mostró por hibridación de fluorescencia in situ que el gen NPY está localizado en 7p15.1 y existe en una sola copia. Comentaron que el NPY es uno de los péptidos más conservados conocidos con, por ejemplo, sólo 3 aminoácidos de diferencia entre humano y tiburón. El neuropéptido Y es un neuromodulador implicado en el control del equilibrio de energía y se sobreproduce en el hipotálamo de ratones ob/ob. Para determinar el papel de NPY en la respuesta a la deficiencia de leptina (164160),

[illegible] MORENO
Y ALEMAN
[illegible]RID

Erickson et al. (1996) generaron ratones ob/ob deficientes en NPY. En ausencia de NPY, los ratones ob/ob eran menos obesos debido a una menor toma de alimento y mayor gasto de energía, y estaban afectados con menos gravedad por diabetes, esterilidad y defectos somatrópicos. Estos resultados se interpretaron como indicadores de que NPY es un efector central de la deficiencia de leptina. Los análisis de ligamiento genético de ratas que se criaron selectivamente para preferencia por alcohol, identificaron una región cromosómica que incluía el gen NPY (Carr et al., 1998). Las ratas que prefieren alcohol tuvieron niveles menores de NPY en diversas regiones cerebrales comparadas con las ratas que no prefieren alcohol. Thiele et al. (1998) estudiaron por lo tanto el consumo de alcohol en ratones que carecían completamente de NPY como resultado de una alteración dirigida del gen (Erickson et al., 1996). Encontraron que los ratones deficientes en NPY mostraban un aumento del consumo, comparado con las ratones de tipo silvestre, de disoluciones que contenían etanol al 6%, 10% y 20% (en volumen). Los ratones deficientes en NPY eran también menos sensibles a los efectos sedantes/hipnóticos del etanol, como mostró una recuperación más rápida del sueño inducido por etanol, incluso aunque los niveles de etanol en plasma no diferían significativamente de los de los controles. En contraposición, los ratones transgénicos que sobreexpresaron un gen NPY marcado en neuronas que habitualmente lo expresan, tuvieron una menor preferencia por el alcohol y fueron más sensibles a los efectos sedantes/hipnóticos del etanol que los controles. Estos datos proporcionaron evidencias directas de que el consumo de alcohol y la resistencia son inversamente proporcionales a los niveles de NPY en el cerebro. Como parte de un estudio en marcha sobre la base genética de la obesidad, Karvonen et al. (1998) identificaron un polimorfismo 1128T-C que resultaba de la sustitución de leucina por prolina en el residuo 7 de la parte péptido señal de pre-pro-NPY. Este polimorfismo no estaba asociado con la obesidad o metabolismo energético, pero estaba significativa y consistentemente asociado con altos niveles de colesterol en suero total y colesterol LDL tanto en sujetos finlandeses de peso normal y obesos como en holandeses obesos. Uusitupa et al. (1998) encontró el polimorfismo en el 14% de los finlandeses, pero sólo en el 6% de los holandeses. Los sujetos con pro7 en NPY tenían, de media, niveles de colesterol total en

[illegible] MORENO

suero de 0,6 a 1,14 mmol/l mayores que aquellos sin esta variante de gen. Puesto que el impacto de pro 7 NPY sobre los niveles de colesterol en suero no pudieron encontrarse en holandeses de peso normal, puede suponerse que las personas obesas son más susceptibles al efecto de la variante del gen. Se calculó que la probabilidad de tener el pro7 en NPY podría ser tan alta como el 50 o 60% en sujetos obesos con un colesterol total en suero igual o mayor a 8 mmol/l. Al menos entre los finlandeses, la forma pro7 de NPY es uno de los factores genéticos más potentes que afectan a los niveles de colesterol en suero. Véase también Allen y Bloom (1986), Dockray (1986), Maccarrone y Jarrott (1986), Minth et al. (1986)".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A: McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a NPYR1 se ha extraido de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY, 162640) es uno de los neuropéptidos más abundantse en el sistema nervioso mamífero y exhibe un variado intervalo de actividades fisiológicas importantes, incluyendo efectos sobre la actividad psicomotriz, toma de alimento, regulación de la secreción endocrina central y potentes efectos vasoactivos sobre el sistema cardiovascular. Se han definido dos grandes subtipos de NPY (Y1 e Y2) por criterios farmacólogicos. Los receptores NPY Y1 se han identificado en una serie de tejidos, incluyendo cerebro, bazo, intestino delgado, riñón, testículos, placenta y músculo liso aórtico. El receptor Y2 se encuentra principalmente en el sistema nervioso central. Herzog et al. (1992) informaron de haber clonado un cDNA que codificaba un receptor de NPY humano que confirmaron que era un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G. Cuando se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón embrionario humano, el receptor exhibió características de especificidad de ligando. En la línea celular de riñón, el receptor se acopló a una proteína G sensible a la toxina pertussis que mediaba la inhibición de la acumulación de AMP cíclico. En la línea celular CHO, por otro lado, el receptor no se acopló a la inhibición de la adenilato ciclasa, sino a la elevación del calcio intracelular. De esta manera, el acoplamiento de segundo mensajero del receptor NPY era específico del tipo celular, dependiendo del repertorio específico

PATRICIA KOSH MORENO

de proteínas G y sistemas de efector presentes en el tipo de célula. Larhammar et al. (1992) clonaron independientemente y caracterizaron el receptor de neuropéptido Y. Herzog et al. (1993) determinaron la organización molecular y la regulación del gen de receptor de NPY Y1. En contraposición con la estructura contigua de la mayoría de los genes de receptor acoplados a proteína G, encontraron que el gen de receptor de NPY Y1 tiene 3 exones. Identificaron también un polimorfismo Pstl común en el primer intrón del gen. Por hibridación in situ con fluorescencia de alta resolución, localizaron el gen en 4q31.3-q32. Herzog et al. (1997) encontraron que los genes NPY1R y NPY5R (602001) están colocalizados en el cromosoma 4q31-q32. Los dos genes se transcriben en direcciones opuestas a partir de una región promotora común. Uno de los exones 5' alternativamente ligados al gen de receptor Y1 es una parte de la secuencia de codificación del receptor Y5. Esta infrecuente disposición sugirió a Herzog et al. (1997) que los 2 genes surgieron por un fenómeno de duplicación de gen y que pueden expresarse coordinadamente. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Lutz et al. (1997) mapearon los genes Npy1r y Npy2r en grupos de ligamiento

PATRICIA M. MORENO
INGLÉS Y ALEMAN
MADRID

conservado en los cromosomas 8 y 3 de ratón, respectivamente, que corresponden con la región distal del cromosoma humano 4q".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibid.). El siguiente texto referente a NPYR2 se ha extraído de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY) señala una familia de receptores acoplados a proteína G presente en el cerebro y neuronas simpáticas. Se han definido al menos 3 subtipos de receptor de neuropéptido Y sobre la base de criteria farmacológicos, distribución en tejido y estructura del gen de codificación, véanse 162641 y 162643. Rose et al. (1995) informaron de la clonación de expresión en células COS de un cDNA para el receptor tipo 2 humano, NPY2R. Las células transfectadas mostraron una alta afinidad por NPY (162640), el péptido YY (PYY, 600781) y un fragmento de NPY que incluía los aminoácidos 13 a 36. La proteína predicha de 381 aminoácidos tiene 7 dominios transmembrana característicos de los receptores acoplados a proteína G y es sólo un 31% idéntico al receptor Y1 humano (NPY1R, 162641). Se detectó un

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN

mRNA de 4 kb por transferencia Northern de muestras de tejido de diversas regiones del sistema nervioso. Gerald et al. (1995) clonaron el cDNA correspondiente al receptor Y2 de una genoteca de expresión de cDNA de hipocampo humano utilizando un ensayo de unión de PYY radiomarcado. Expresaron el gen Y2 en células COS-7 y realizaron un ensayo de unión a hormona que mostró que el receptor Y2 se une (de mayor a menor afinidad) a las hormonas PYY, NPY y polipéptido pancreático (PP, 167780). Ammar et al. (1996) clonaron y caracterizaron el gen humano que codifica el receptor NPY de tipo 2. La copia abarca 9 kb de secuencia genómica y está codificada en 2 exones. Como en el gen de receptor NPY de tipo 1, la región no traducida de 5' de NPY2R está interrumpida por una secuencia intermedia de 4,5 kb. Ammar et al. (1996) demostraron por análisis Southern de híbridos celulares roedor-humano seguido de hibridación in situ por fluorescencia (FISH) que el gen NPY2R se mapea en 4q31, la misma región que contiene el gen NPY1R, sugiriendo que estos subtipos pueden haber surgido de duplicación de gen a pesar de sus diferencias estructurales. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Lutz et al. (1997) mapearon los genes Npy1r y Npy2r en grupos de

PATRICIA KOEN MORENO
INGLES Y ALEMAN

ligamiento conservado en los cromosomas 8 y 3 de ratón, respectivamente, que corresponden a la región distal del cromosoma humano 4q".

Se presenta un ensayo para determinar si un agente putativo o real según la presente invención puede unirse a NPY en el documento WO-A-98/52890 (véase la página 96 de éste, líneas 2 a 28).

I:NPY

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:NPY (a veces referido como antagonista de NPY).

Se discuten I:NPY (en particular antagonistas de NPY) en los siguientes artículos de revisión:

Dunlop J., Rosenzweig-Lipson, S.: Therapeutic approaches to obesity, Exp. Opin. Ther. Pat. 1999, 8, 12, 1683-1694.

Wang S., Ferguson K.C., Burris T.P., Dhurandhar N.V.: 8th annual international conference on obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus: novel drug developments. Exp. Opin. Invest. Drugs 1999, 8, 7, 117-1125.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible]

Ling A.L.: Neuropeptide Y receptor antagonists. Exp. Opin. Ther. Pat. 1999, 9, 4, 375-384. Adham N., Tamm J., Du P., Hou C., et al: Identification of residues involved in the binding of the antagonist SNAP 6608 to the Y5 receptor. Soc. Neurosci.Abstr. 1998, 24, parte 2, 626.9.

Shu Y.Z., Cutrone J.Q., Klohr S.E., Huang S.: BMS-192548, a tetracyclic binding inhibitor of neuropeptide Y receptors, from Aspergillus niger. WB2346. II. Physico-chemical properties and structural characterization. J. Antibiot. 1995, 48, 10, 1060-1065.

Rigollier P. Rueger H., Whitebread S., Yamaguchi Y., Chiesi M., Schilling W., Criscione L.: Synthesis and SAR of CGP 71683A, a potent and selective antagonist of the neuropeptide Y Y5 receptor. Int. Sy,p. Med. Chem., 1998, 15th Edinburgo, 239.

Criscione L., Rigollier P., Batzl-Hartmann C., Rueger H., Stricker-Krongrad A., et al: Food Intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. J. Clin. Invest. 1998, 102, 12, 2137-2145.

Neurogen Corp: NGD 95-1. Clin. Trials Monitor. 1996, 5, 10,

PAT[illegible]
[illegible] Y EL [illegible]AN
[illegible]RID
Tel. [illegible]

Ab 19244.

Buttle L.A.: Anti-obesity drugs: on target for huge market sales. Exp. Opin. Invest. Drugs 1996, 5, 12, 1583-1587.

Gehlert D.R., Hipskind, P.A.: Neuropeptide Y receptor antagonists in obesity. Exp. Opin. Invest. Drugs, 1996, 7, 9, 1827-1838.

Goldstein D.J., Trautmann M.E.: Treatments for obesity. Emerging Drugs, 1997, 2-1-27.

Hipskind P.A., Lobb K.L., Nixon J.A., Britton T.C., Bruns R.F., Catlow J., Dieckman, McGinty D.K., Gackenheimer S.L., Gitter B.D., Iyengar S., Schober D.A. et al: Potent and selective 1,2,3-trisubstituted indole NPY Y-1 antagonists. J. Med. Chem. 1997, 40, 3712-3714.

Zimmerman D.M., Cantrall B.E., Smith E.C.R., Nixon J.A., Bruns R.F., Gitter B., Hipskind P.A., Ornstein P.L., Zarrinmayeh H., Britton T.C., Schober D.A., Gehlert D.R.: Structure-activity relationships of a series of 1-substituted-4-methilbenzimidazole neuropeptide Y-1 receptor antagonists. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1998, 8, 5, 473-476.

[illegible]
INGLES Y ALEMAN
[illegible] 13
[illegible] MADRID

Zarrinmayeh H., Nunes A., Ornstein P., Zimmerman D., Arnold M.B., et al.: Synthesis and evaluation of a series of novel 2-[(4-chlorophenoxy)methyl]benzimidazoles as selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. J. Med. Chem. 1998, 41, 15, 2709-2719.

Britton T.C., Spinazze P.G., Hipskind P.A., Zimmerman D.M., Zarrinmayeh, H., Schober D.A., Gehlert D.R., Bruns R.F.: Structure-activity relationships of a series of benzotiophene-derived NPY-Y1 antagonists: optimization of the C2 side chain. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1999, 3, 475-480.

Zarrinmayeh H., Zimmerman D.M., Cantrell B.E., Schober D.A., Bruns R.F., Gakenheimer S.L., Ornstein P.L., Hipskind P.A., Britton T.C., Gehlert D.R.: Structure-activity relationship of a series of diaminoalkyl substituted benzimidazole as neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. Bioorganic, Med. Chem. Lett. 1999, 5, 647-652.

Murakami Y., Hara H., Okada T., Hashizume S., Kii, M., Ishihara, Y., Ishikawa, M., Mihara, S-I., Kato, G., Hanasaki, K., Hagishita, S., Fujimoto M.: 1,3-disubstituted benzazepines as novel, potent, selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. J. Med. Chem. 1999, 42, 14, 2621-

[illegible] - MADRID

457

2632.

Rudolf K., Eberlein W., Engel W., Wieland H.A., Willim K.D., Entzeroth M., Wienen W., Beck Sickinger A.G., Doods, H.N.: The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur. J. Pharmacol. 1994, 271, 2-3, R11-R13.

Wieland H.A., Willin K.D:, Entzeroth M., Wienen W., Rudolf K., Eberlein W. Engel W., Doods H.N.: Subtype selectivity and antagonist profile of the nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1995, 275, 1, 143-149.

Wright J., Bolton G., Creswell M., Downing D., Georgic L., Heffner T., Hodges J., MacKenzie R., Wise L.: 8-amino-6-(arylsulphonyl)-5-nitroquinolones: novel nonpeptide neuropetide Y1 receptor antagonists. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1996, 6, 15, 1809-1814.

Capurro D., Huidobro-Toro J.P.: The involvements of neuropeptide Y Y1 receptors in the blood pressure baroreflex: studies with BIBP 3226 and BIB 3304. Eur. J. Pharmacol. 1999, 376, 3, 251-255.

458

Dumont Y., Cadieux A., Doods H., Quirion R.: New tools to investigate neuropeptide Y receptors in the central and peripheral nervous systems: BIBO-3304 (Y1), BIIE-246 (Y2) y [125I]-GR-231118 (Y1/Y4). Soc. Neurosci. Abstr. 1999, 25, parte 1, Aptdo. 74.11.

Hedge S.S., Bonhaus D.W., Stanley W., Eglen R.M., Moy T.M., Loeb M., et al.: Pharmacological evaluation of 1229U91, a high affinity and selective neuropeptide Y(NPY)-Y1 receptor antagonist. Pharmacol. Res. 1995, 31, 190.

Matthews J.E., Chance W.T., Grizzle M.K., Heyer D., Daniels A.J.: Food intake inhibition and body weight loss in rats treated with GI 264879A, an NPY-Y1 receptor. Soc. Neurosci. Abstr. 1997, 23, parte 2, 1346.

Doods H.N., Willim K-D., Smith S.J.: BIBP 3226: a selective and highly potent NPY-Y1 antagonist. Proc. Br. Pharmacol. Soc. 1994, 13-16, Dec. 47.

Rudolf K., Eberlein, W., Engel W., Wieland H.A., Willim K.D., Entzeoth M., Wienen W., Beck Sickinger A.G., Doods H.N.: The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur. J. Pharmacol. 1994, 271, 2-3, R11-R13.

PATRICIA KOCH MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
C. ..., 113
MADRID
Telf. ...

Serradell-Le-Gal C., Valette G., Rouby P.E., Pellet A., Villanova G., Foulon L., Lespy L., Neliat G., Chambon J.P., Maffrand J.P., Le-Fur G.: SR 120107A y SR 120819A: Two potent and selective, orally-effective antagonists for NPY Y1 receptors. Soc. Neurosci. Abstr. 1994, 20, parte 1, 907, Aptdo. 376.14.

Hong Y., Gregor V., Ling A.L., Tompkins E.V., Porter J. Chou T.S., Paderes G., Peng Z., Hagaman C., Anderes K., Luthin D., May J.: Synthesis and biological evaluation of novel guanylurea compounds as potent NPY Y1 receptor antagonist. Acs 1999, 217, Anaheim MEDI 108.

Se describen I:NPY (en particular antagonistas de NPY) en los siguientes documentos:

WO-98/07420
WO-94/00486
WO-96/22305
WO-97/20821
WO-97/20822
WO-96/14307
JP-07267988
WO-96/12489
US-5552422

[illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

WO-98/35957

WO-96/14307

WO-94/17035

EP-0614911

WO-98/40356

EP-0448765

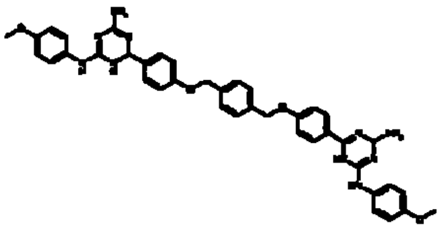
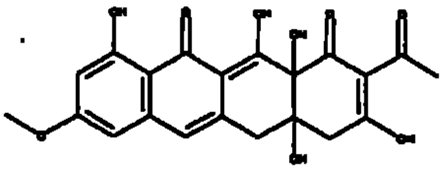
EP-0747356

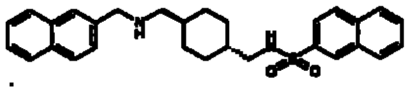
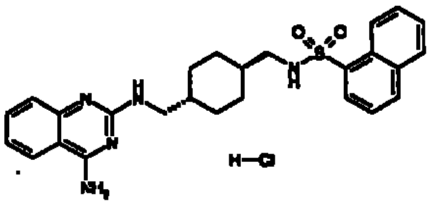
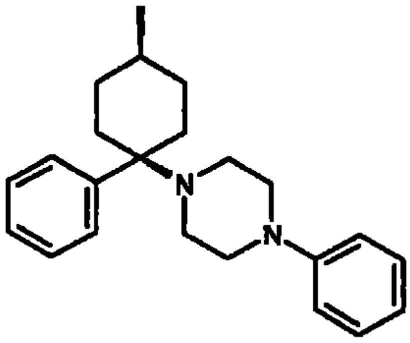
WO-98/35941

WO-97/46250

EP-0747357

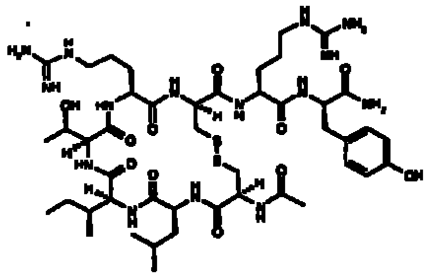
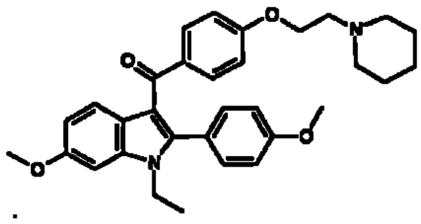
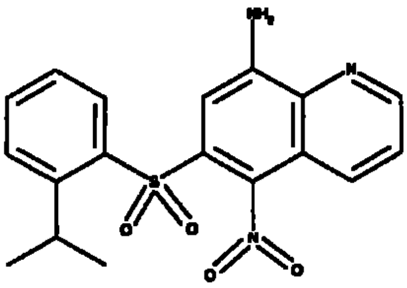
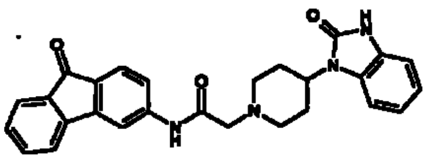
Los ejemplos preferidos de I:NPY se seleccionan de las siguientes estructuras:

| Compuesto | Estructura | Modo de acción<br>Referencias |
|---|---|---|
| F34 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/07420<br>Ref. 3 |
| F35 |  | I:NPY<br>Ref. 5 |

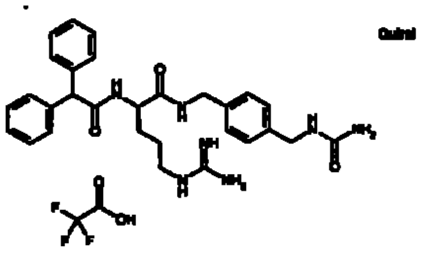
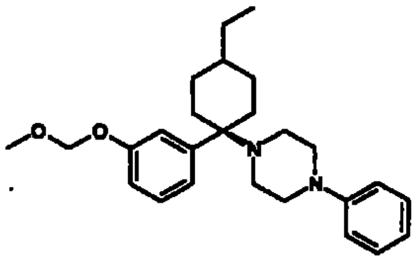
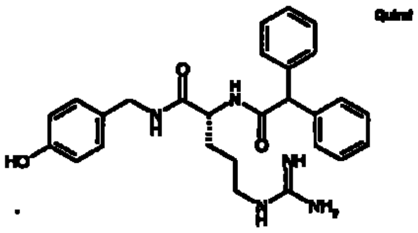
| | | |
|---|---|---|
| F36 |  | I:NPY Y5<br>Ref 1,4 |
| F37 | dímero disulfuro (2,2'),(4,4') cíclico Ile-Cys-Pro-Cys-Tyr-Arg-Leu-Arg-Tyr-NH2 | I:NPY Y1<br>WO-94/00486<br>WO-96/22305<br>Ref. 1, 2, 23 |
| F38 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/20821<br>WO-97/20822<br>Ref. 1, 3, 6, 7 |
| F39 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref. 1, 8, 9, 10, 11 |

[illegible] 113 [illegible] MADRID

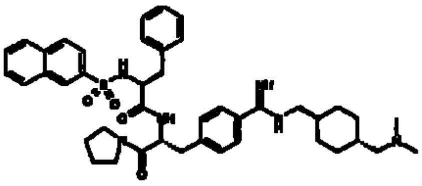
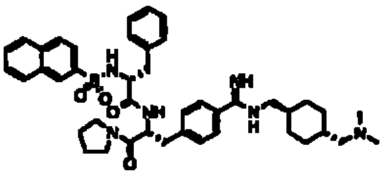
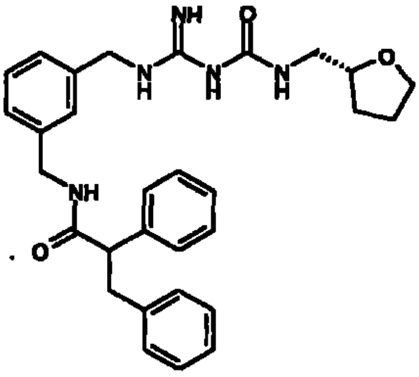
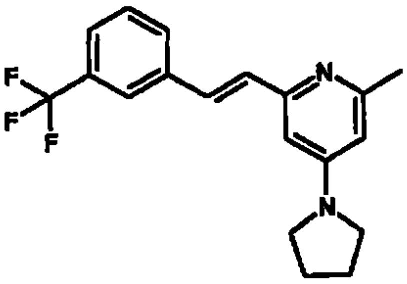
462

| | | |
|---|---|---|
| F40 |  | I:NPY Y1<br>JP-07267988<br>Ref. 1 |
| F41 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/12489<br>Ref. 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |
| F42 |  | I:NPY Y1<br>US-5552422<br>Ref. 17, 18, 19, 20 |
| F43 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/35957<br>Ref. 3 |

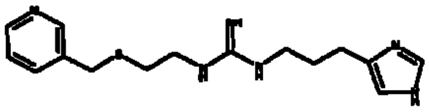
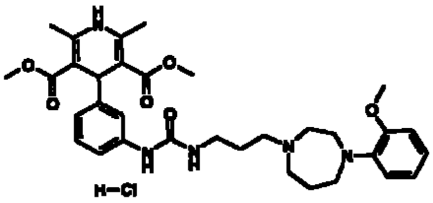
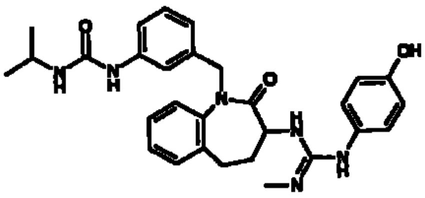
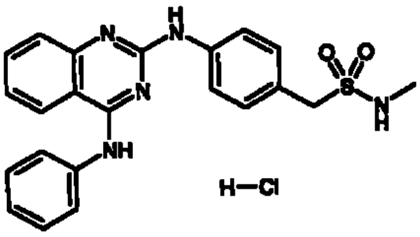
[illegible] MADRID

| | | |
|---|---|---|
| F44 |  | I:NPY Y1<br>Ref. 21, 22 |
| F45 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref. 3 |
| F46 | ? | I:NPY Y1<br>Ref. 24 |
| F47 |  | I:NPY Y1<br>WO-94/17035<br>Ref. 3, 17, 15, 26 |
| F47 | | I:NPY Y1<br>Ref. 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |

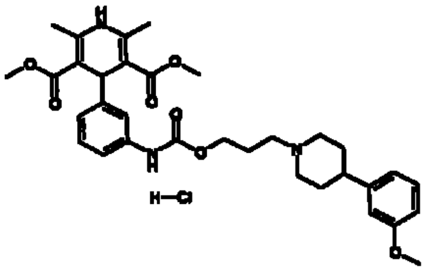
MORENO
LEMAN
113
MADRID

| | | |
|---|---|---|
| F48 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref. 27 |
| F49 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27. |
| F50 |  | I:NPY Y1<br>Ref. 28 |
| F51 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/40356 |

[illegible] Y ALEMAN
[illegible] 113
[illegible]ADRID

| | | |
|---|---|---|
| F52 |  | I:NPY<br>EP-0448765 |
| F53 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747356 |
| F54 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/35941 |
| F55 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/46250 |

113 MADRID

| | | |
|---|---|---|
| F56 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747357 |

VIP (péptido intestinal vasoactivo)

Según un aspecto de la presente invención, un objetivo de $P_{cAMP}$ es VIP o uno de sus receptores asociados. La clasificación/nomenclatura actual se refiere a estos como VPAC1, VPAC2 y PACAP.

Las secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos para VIP y sus receptores están disponibles en la literatura. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

Hemos mostrado que VPAC1 y VPAC2 están presentes en la vagina humana y de conejo. PACAP estaba ausente tanto de vagina de conejo como humana.

VIP es un importante neurotransmisor endógeno liberado

Teléf. 516 39 90 - MADRID

467

durante la excitación sexual que es responsable de la vasodilatación vaginal inducida por nervio del lecho vascular localizado en la pared vaginal. Estos efectos vasodilatadores están mediados por la activación de adenilato ciclasa y la producción de cAMP. Sin pretender limitarse a la teoría, este efecto puede estar mediado a través de receptores de VIP subtipos $VPAC_1$, $VPAC_2$ o PACAP (péptido activador de la adenilato ciclasa en la pituitaria). Los receptores $VPAC_2$ y PACAP son los más ampliamente extendidos en el SNC y estos receptores, a pesar de expresarse en la pituitaria, parecen no tener una función biológica extendida.

El agente de la presente invención podría potenciar el VIP y/o actuar como un mimético o análogo de éste. El agente potenciaría entonces y/o imitaría los efectos vasorrelajantes del VIP endógeno liberado durante la excitación sexual. El agente puede tener también un efecto aditivo sobre la relajación del músculo liso vaginal inducido por VIP. Clínicamente, esto conducirá al tratamiento de FSAD mediante el aumento de la lubricación vaginal a través de la congestión y flexibilidad de la pared vaginal.

Un agente adecuado piede ser un análogo de VIP.

MORENO
LEMAN
13
MADRID

Las explicaciones de los antecedentes sobre VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente al VIP se ha extraído de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP), un péptido de 28 aminoácios aislado originalmente de duodeno porcino, está presente no sólo en tejidos gastrointestinales sino también en tejidos neurales, posiblemente como neurotransmisor, y exhibe una amplia variedad de acciones biológicas. Debido a que el VIP muestra similitudes con el glucagón, secretina y el péptido inhibitorio gástrico (GIP), se ha considerado un miembro de la familia de glucagón-secretina. El producto primario de traducción del mRNA que codifica el VIP (prepro-VIP) tiene un peso molecular de 20 dalton. Por clonación de la secuencia de DNA complementaria al mRNA que codifica el VIP humano, Itoh et al. (1983) encontraron que el precursor de VIP contiene no sólo VIP sino también un nuevo péptido de 27 aminoácidos, designado como PHM27, que tiene histidina aminoterminal y metionina carboxiterminal. Difiere del PHI17 aislado de

MORENO
113
MADRID

469

intestino porcino en 2 aminoácidos, PHI27, como su designación indica, tiene isoleucina carboxiterminal. Linder et al. (1987) aislaron el gen humano de VIP y PHM27 y estudiaron su expresión en diversos tejidos de rata. Heinz-Erian et al. (1985) sugirieron que la deficiente innovación de las glandulas sudoríparas de los pacientes con fibrosis quística por el neuropéptido VIP podría ser un mecanismo básico de reducción del contenido de agua y de impermeabilidad relativa del epitelio al cloruro y a otros iones que caracteriza a la fibrosis quística. Para comprobar esta hipótesis, Gozes et al. (1987) tomaron el enfoque de "gen candidato". Bodner et al. (1985) habían mostrado que el VIP y el PHM-27 están codificados por exones adyacentes. Gozes et al. (1985) utilizaron el fragmento genómico de codificación de PHM-27 para detectar la presencia del gen VIP en 6q21-qtre. De esta manera, eliminaron un gen defectivo de VIP como candidato a causa primaria de fibrosis quística (que está codificada en el cromosoma 7). Por técnicas de hibridación in situ, Gozes et al. (1987) asignaron el gen VIP a 6q24. Esto colocó a VIP en la región de MYB (189990), que se ha mapeado en 6q22. Gozes et al. (1987) investigaron una relación funcional entre los 2 genes en tejido

[illegible] MORENO
[illegible]
113
MADRID

470

neuronal. Observaron un pico agudo de mRNA de MYB en el hipocampo en ratas de 3 días de edad, antes del pico de mRNA de VIP que aparece en este área a los 8 días de edad. Omary y Kagnoff (1987) encontraron receptores nucleares para VIP en una línea celular de adenocarcinoma colónico humano. Gotoh et al. (1988) asignaron a VIP al cromosoma 6 por hibridación de transferencia de manchas de un fragmento clonado molecularmente del gen a cromosomas clasificados. La localización se refinó a 6q26-q27 por hibridación in situ".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a VIPR1 o VPAC1 se ha extraido de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP, 1932320) es un mediador neuroendocrino octacosamérico encontrado principalmente en neuronas presinápticas colinérgicas del sistema nervioso central y en neuronas peptidérgicas periféricas que inervan diversos tejidos. De los muchos pétidos neuroendocrinos con funciones inmunológicas, VIP se distingue por su capacidad de afectar tanto a células B como T

MORENO
MADRID

directamente. Los distintos subconjuntos de células neurales, respiratrioas, gastrointestinales e inmune llevan receptóres de alta afinidad específicos de VIP, que están asociados con una proteína de unión al nucleótido guanina (G) capaz de activar la adenilato ciclasa. Libert et al., (1991) obtuvieron 4 nuevos receptores de la familia de receptores acoplados a proteína G por amplificación selectiva y clonación de cDNA tiroide. Uno de ellos, RDC1, se identificó como el receptor de VIP por Sreedharan et al (1991). Libert et al. (1991) mapearon el gen VIPR en 2q37 por hibridación in situ. Informaciones posteriores hicieron dudoso que el gen mapeado en 2q37 fuera de hecho el gen del receptor de VIP (Vassart, 1992). La secuencia que se designó como GPRN1 por Sreedharan et al. (1991) y se mapeó en 2q37 se encontró que no unía VIP según Wenger (1993). Sreedharan et al. (1995) aislaron un gen del receptor de VIP de tipo I auténtico y lo localizaron por hibridación de fluorescencia in situ en la banda de 3p22 en una región asociada con cáncer de pulmón de células pequeñas. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Hashimoto et al. (1999) clonaron el gen Vipr1 de ratón en la región distal del cromosoma 9, una región que muestra homología de sintenia con el cromosoma humano 3p. Sreedharan et al. (1993) clonaron un gen del receptor de VIP intestinal humano, la secuencia de aminoácidos deducida comparte el 84% de identidad con el receptor de VIP de pulmón de rata. Couvineau et al. (1994) aislaron 2 clones de cDNA de VIPR a partir de una genoteca de cDNA de célula epitelial de yeyuno humano. Uno codifica un receptor de VIP que consiste en 460 aminoácidos y que tiene 7 dominios transmembrana putativos, como otros receptores acoplados a proteína G. El otro codifica una proteína relacionada con el receptor de VIP de 495 aminoácidos que exhibe un 100% de homología con el receptor de VIP funcional a lo largo de 428 aminoácidos y en la región C-terminal, pero que contiene un dominio N-terminal completamente divergente de 67 aminoácidos. Cuando se expresa en células COS-7, la segunda proteína no une VIP radioyodado, aunque se dirigió normalmente a la membrana plasmática como se evaluó por estudios de inmunofluorescencia. El receptor de VIP de tipo I, también denominado receptor PACAP de tipo II (véase 102981 para otro tipo de receptor PACAP), se encontró por parte de Sreedharan et al. (1995) que abarcaba aproximadamente 22 kb y comprendía 13 exones (entre 42 a 1.400 pb) y 12 intrones (entre 0,3 y 6,1 kb).

Sreedharan et al. (1995) caracterizaron también le promotor y la región adyacente 5' del gen".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a VIPR2 o VPAC2 se ha extraido de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP, 192320) y polipéptido activante de la adenilato ciclasa en pituitaria (PACAP, 102980) son péptidos homólogos que funcionan como neurotransmisores y hormonas neuroendocrinas. Aunque los receptores de VIP y PACAP comparten homología, difieren en sus especificidades de sustrato y patrones de expresión. Veáse VPR1 (192321) y ADCYAP1R1 (102981). Svoboda et al. (1994) realizaron una PCR de bajo rigor utilizando cebadores basados en secuencias conservadas entre los receptores de VIP. Clonaron el gen del receptor de VIP2 humano de una genoteca de cDNA de linfoblasto. Este gen codificaba un polipéptido de 438 aminoácidos que comparte el 86% de identidad con el receptor de VIP2 de rata. Expresaron el receptor de VIP2 humano en células de ovario de hámster chino y encontraron que se une a PACAP-38, PACAP-27, VIP y helodermina, y esa unión del receptor a cualquiera de estos péptidos activa la adenilato ciclasa. Se encontró que la unión de péptidos estaba inhibida por GTP. Adamou et al. (1995) clonaron el gen del receptor de VIP2 de una genoteca de cDNA de placenta humana. La transferencia Northern reveló que VIPR2 se expresaba como 2 copias de 4,6 kb y 2,3 kb a altos niveles en el músculo esquelético y a niveles menores en corazón, cerebro, placenta y páncreas. Mackay et al. (1996) utilizaron hibridación in situ de fluorescencia para mapear el gen VIPR2. Posteriores mapeados con líneas celulares derivadas de pacientes con holoprosencefalia tipo 3 (HPE 3, 142945) revelaron que el gen VIPR2 se encuentra en la región crítica mínima HPE3. MacKay et al (1996) afirmaron que aunque VIPR2 puede contribuir al fenotipo de HPE3, no es el único factor responsable".

AC (adenilato ciclasa)

Según un aspecto de la presente invención, un objetivo $P_{cAMP}$ es AC.

Las secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de AC están disponibles en la literatura.

[illegible] MORENO [illegible] MADRID

Para confirmar que VIP induce vasorrelajación a través de la elevación de los niveles de cAMP intracelular y la consiguiente activación de la adenilato ciclasa, hemos medido las concentraciones de cAMP vaginal durante la estimulación con VIP y utilizando forskolina, un activador de adenilato ciclasa, para imitar los efectos de activar la ruta cAMP/adenilato ciclasa.

En estos estudios, encontramos que el tratamiento con VIP y forskolina eleva las concentraciones intracelulares de cAMP en tejido vaginal aislado.

También encontramos que la forskolina aumenta el flujo sanguíneo vaginal en un modelo animal para excitación sexual.

Además encontramos que la forskolina induce la relajación en la vagina aislada.

Las explicaciones de los antecedentes sobre AC y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a AC se ha extraído de esa fuente.

"La adenilato ciclasa (EC 4.6.1.1) cataliza la transformación de ATP en AMP cíclico. La actividad enzimática está bajo el control de varias hormonas, y diferentes polipéptidos participan en la transducción de la señal del receptor al resto catalítico. Los receptores estimuladores o inhibidores (Rs y Ri) interactúan con las proteínas G (Gs y Gi) que exhiben actividad GTPasa y modulan la actividad de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. Parma et al. (1991) clonaron un cDNA correspondiente a adenililciclasa de cerebro humana, simbolizada por ellos como HBAC1. Por hibridación in situ a extensiones cromosómicas en metafase utilizando la sonda de cDNA de cerebro humano, Stengel et al. (1992) mostraron que el gen está localizado en 8q24.2. Se asignó un gen altamente homólogo, ADCY2 (103071) a 5p15.3 mediante el mismo procedimiento".

## TECNICAS DE METODOLOGIA GENERAL DE DNA RECOMBINANTE

Aunque en general las técnicas mencionadas en la presente son bien conocidas en la técnica, puede hacerse referencia en particular a Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) y Ausubel et al., Short Protocols

477

in Molecular Biology (1999), 4ª edición, John Wiley & Sons, Inc. Se describe la PCR en los documentos US-A-4683195, US-A-4800195 y US-A-4965188.

RESUMEN

En resumen, la presente invención se refiere a:

1. Una composición farmacéutica para uso consiguiente en el tratamiento de FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSD, en particular FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD.

3. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es

MORENO
MADRID

capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto a un agente con cAMP y medir la actividad de cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de FSD, en particular FSAD.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a:

5. Una composición farmacéutica para uso consiguiente en el tratamiento de FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y estando el agente

[illegible] MADRID

seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

6. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSD, en particular FSAD, siendo el agente capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$

[illegible] Teléf. [illegible] MADRID

I:NPY

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

$P_{cAMP}$.

7. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP

I:$PDE_{cAMP}$

I:$PDEn_{cAMP}$

I:NPY

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

MORENO
MADRID
Tel.

$\mathrm{A:VIPr}$

$\mathrm{A:VIP}_n$

$\mathrm{I:I:VIPr}$

$\mathrm{I:I:VIP}_n$

$\mathrm{P}_{cAMP}$.

8. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo la determinación de si un agente putativo es capaz o no de actuar como uno o más de:

un mimético de cAMP

$\mathrm{I:PDE}_{cAMP}$

$\mathrm{I:PDEn}_{cAMP}$

I:NPY

$\mathrm{I:NPY\ Y}_n$

I:NEP

$\mathrm{U:A}_{cAMP}$

A:AC

$\mathrm{A:VIPr}$

$\mathrm{A:VIP}_n$

$\mathrm{I:I:VIPr}$

$\mathrm{I:I:VIP}_n$

$\mathrm{P}_{cAMP}$.

[illegible] MORENO
[illegible] Y [illegible]
[illegible] 113
[illegible]ADRID

482 ╪

en el que si el agente putativo es capaz de actuar como uno o más de

un mimético de cAMP
$I:PDE_{cAMP}$
$I:PDEn_{cAMP}$
I:NPY
$I:NPY\ Y_n$
I:NEP
$U:A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
$A:VIP_n$
I:I:VIPr
$I:I:VIP_n$
$P_{cAMP}$.

entonces el agente puede ser útil en el tratamiento de FSD, en particular FSAD.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a:

9. Una composición farmacéutica para uso consiguiente en la estimulación del flujo sanguíneo vaginal, comprendiendo

[illegible] MORENO [illegible] MADRID

la composición farmacéutica un agente capaz de estimlar la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal, siendo el agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra.

11. Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra de modo que produzca un aumento del flujo sanguíneo vaginal.

## EJEMPLOS

La presente invención se describirá a continuación, sólo como ejemplos, en los que se hace referencia a las siguientes Figuras:

La Figura 1 que es un gráfico,

[illegible] MORENO [illegible] MADRID

La Figura 2 que es un gráfico,

La Figura 3 que es un gráfico,

La Figura 4 que es un gráfico,

La Figura 5 que es un gráfico,

La Figura 6 que es un gráfico,

La Figura 7 que es un gráfico, y

La Figura 8 que presenta algunas fórmulas de compuestos.

Más detalladamente:

Figura 1. Estimulación eléctrica del nervio pélvico que induce un aumento dependiente de la frecuencia en el flujo sanguíneo vaginal en el modelo de conejo anestesiado de excitación sexual. Al aumentar la frecuencia de estimulación se inducen mayores aumentos del flujo sanguíneo. Se monitorizaron los cambios utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 2. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) induce aumentos en el flujo sanguíneo vaginal en el modelo de conejo anestesiado de respuesta sexual. La Figura 2A ilustra cómo aumenta el flujo sanguíneo vaginal de manera depndiente de la concentración por infusiones de VIP (bolo intravenoso). La Figura 2b demuestra que 2 infusiones repetidas de VIP producen aumentos similares en el flujo

MADRID

sanguíneo. Obsérvese que la duración de la respuesta es también similar. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 3. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) reduce la presión sanguínea arterial media en el modelo de conejo anestesiado de excitación sexual. Esta gráfica ilustra los efectos típicos de los agentes vasoactivos, y los parámetros de estimulación utilizados para investigar el flujo sanguíneo en la vagina, sobre la presión arterial media en un conejo anestesiado. Estos efectos observados son típicos de las tendencias vistas en todos los animales ensayados. VIP indujo una depresión significativa de la presión arterial media, mientras que la estimulación del nervio pélvico, las infusiones de control de hepsaline o los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ o NEP no tienen efecto sobre la presión sanguínea. Obsérvese que la reducción de la presión sanguínea asociada con las infusiones de VIP está también asociada a un gran aumento del ritmo cardiaco.

Figura 4. Activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa imita la vasorrelajación mediada por VIP y la relajación de músculo liso en tejido vaginal. La Figura 4a ilustra que una infusión de forskolina (40 nmol/kg/bolo intravenoso) induce aumentos significativos en el flujo sanguíneo

vaginal. Obsérvese que la amplitud y duración de la respuesta es similar a la inducida por VIP (20,0 µg/kg bolo intravenoso). Resulta interesante que los efectos sobre el flujo sanguíneo tienen una duración mayor de acción sobre la pared vaginal externa. Todos los cambios se monitorizaron utilziando tecnologías de láser Doppler. La Figura 4b demuestra que tanto VIP (0,1 µM) como forskolina (10 µM) elevan significativamente las concentraciones intracelulares de cAMP por encima de los niveles basales en vagina de conejo. La Figura 4c muestra que la forskolina induce potentes relajaciones en bandas vaginales de conejo precontraídas (1 µM de fenilefrina) con un CI de alrededor de 300 nM. Se cuantificaron todos los cambios utilizando tecnologías de láser Doppler in vivo, inmunoensayo enzimático de cAMP bioquímico o relajación de tejidos in vitro.

Figura 5. Un inhibidor selectivo de NEP EC 3.4.24.11 estimula el aumento del flujo sanguíneo vaginal por estimulación del nervio pélvico (PNS) en el modelo de conejo anestesiado de excitación sexual. PNS repetidas con intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (barra blanca). La administración de un inhibidor de NEP (barra negra) estimula el aumento del pico en el flujo sanguíneo vaginal inducido por

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
Telé. [illegible]

frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4Hz), comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control o controles de vehículo coincidentes en el tiempo (barra gris). Se observaron los siguientes aumentos dependientes de la dosis: 0,1 mg/kg, iv, indujo un aumento del 35,0 ± 7,6%, 0,3 mg/kg, iv, indujo un aumento del 42,6 ± 27,7% y 1,0 mg/kg, iv, indujo un aumento de 52,8 ± 32,5% (media ± sem, n = 3). El inhibidor de NEP no tuvo efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (no estimulado). Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 6. Los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 estimulan los aumentos de flujo sanguíneo vaginal inducidos por VIP en el modelo de conejo anestesiado de excitación sexual. Las infusiones de VIP repetidas en intervalos de 30 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b). El inhibidor de NEP potencia la amplitud y prolonga la duración del flujo sanguíneo estimulado cuando estos aumentos estan inducidos por dosis submáximas de VIP, por ejemplo 0,3 μg/kg. A dosis de VIP que inducen aumentos máximos en el flujo sanguíneo vaginal, por ejemplo 3 μg/kg, los inhibidore de NEP potencian sólo la duración del flujo sanguíneo vaginal. Se muestran los aumentos inducidos por VIP en presencia de un

MORENO

inhibidor de NEP como triángulos negros, mostrándose las respuestas de control VIP como triángulos blancos. La infusión de control de hepsaline no tiene efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando técnologías de láser Doppler.

Figura 7. Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal estimulados por nervio pélvico (PNS) en el modelo de conejo anestesiado de excitación sexual. Las PNS repetidas en intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (cuadrados blancos). La administración del inhibidor de $PDE_{cAMP}$ tipo 2 estimuló el aumento de pico en el flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (cuadrados negros, a 4Hz) comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control de tiempo coincidente (cuadrados abiertos). Una infusión del inhibidor PDE2 (500 µg/kg) indujo una estimulación de 86,8 ± 21,9% en el flujo sanguíneo vaginal (media ± sem, n= 2). Todos los cambios se monitorizaron utilizando técnologías de láser Doppler.

Figura 8: Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal inducidos por VIP en el modelo de conejo anestesiado de excitación

sexual. Las infusiones de VIP repetidas en intervalos de 30 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b). Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 (25 µg/kg, bolo intravenoso) potencia la duración del flujo sanguíneo vaginal estimulado inducido por VIP (3 µg/kg, bolo intravenoso). Los aumentos inducidos por VIP en presencia de un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ se muestran como triángulos negros, mientras que las respuestas control de VIP se muestran como triángulos blancos. La infusión control de hepsaline no tuvo efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

## UN ENSAYO PARA MEDIR LAS ACTIVIDADES/NIVELES DE cAMP

Medida de cAMP de muestras de tejidos vaginales utilizando un estuche de inmunoensayo enzimático (EIA) para cAMP de Biotrak (Amersham Life Sciences RPN 225).

Los niveles de cAMP se miden por EIA en muestras de tejido vaginal. El EIA se basa en la competición entre cAMP sin marcar y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa para una cantidad limitada de anticuerpo específico de cAMP.

## 1. MATERIALES

Todos los materiales se suministran por el estuche EIA para cAMP de Amersham Life Sciences (RPN 225), a menos que se indique otra cosa.

1.1 Placa de microvaloración. Placa de 96 pocillos recubierta con IgG de asno anti-conejo.

1.2 Tampón de ensayo. Tampón acetato de sodio 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% al reconstituir. Los contenidos del frasco se transfieren a un cilindro graduado utilizando lavados de agua destilada 3 x 15 ml. El volumen final se ajusta entonces a 500 ml.

1.3 cAMP patrón (para el procedimiento de acetilación). cAMP a 10,24 pmol/ml en tampón acetato 0,05, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% al reconstituir. Se disuelve el patrón en 2,5 ml de tampón de ensayo para su uso.

1.4 Antisuero. Anticuerpo anti-cAMP en tampón acetato 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% al reconstituir. Antes de su uso, se diluye el anticuerpo con 11 ml de tampón de ensayo y se mezcla por inversión suave para disolver los contenidos.

1.5 Conjugado de cAMP. cAMP-peroxidasa de rábano picante en tampón acetato 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% al reconstituir. Antes de su uso, se diluye el anticuerpo con 11 ml de tampón de ensayo y se mezcla por inversión suave para disolver los contenidos.

1.6 Tampón de lavado. Tampón fosfato 0,01 M, pH 7,5, que contiene Tween™20 al 0,05% (v/v) al reconstituir. Se transfieren los contenidos del frasco a un cilindro graduado utilizando lavados de agua destilada 3 x 15 ml. El volumen final se ajusta a 500 ml.

1.7 Sustrato TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)/peróxido de hidrógeno en dimetilformamida al 20% (v/v).

Preparado para su uso.

1.8 Reactivo de acetilación. 2 ml de anhídrido acético, 4 ml de trietilamina, preparado como sea necesario.

1.9 Acido sulfúrico (1M). Se prepara ácido sulfúrico 1 M a partir de una disolución madre 18M (BDH).

Se añaden 11 ml a 18,8 ml de agua destilada.

## 2. EQUIPAMIENTO ESPECIFICO

2.1 Tubos de ensayo de vidrio de 5 ml desechables.

2.2 Lector espectrofotométrico de placas (Spectra max 190)

2.3 Agitador de placas de microvaloración (Luckham R100).

## 3. PROCEDIMIENTOS

- Preparación de muestra de tejido. Se trataron los tejidos con el pretratamiento relavante en muestras de 5 ml de disolución fisiológica de sal, por ejemplo agonistas, miméticos de cAMP, etc. Después del tratamiento, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y después se trituraron utilizando un martillo. Se rascó el polvo en un tubo de centrífuga y se añadió 1 ml de ácido perclórico 0,5 M enfriado con hielo (PCA). Se agitó con vórtice la muestra, se mezcló y se dejó en hielo durante 1 hora.
- Extracción de cAMP de muestras de tejido. Se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en otros tubos de centrífuga. Se conservó el sedimento para análisis de proteína a -80°C. Se neutralizaron después las muestras de sobrenadante a pH 6 utilizando $K_3PO_4$. Se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se lavó 4 veces con 5 volúmenes (5 ml) de éter dietílico saturado de agua. Se descartó la capa superior de éter después de cada lavado. Se transfirió la capa acuosa a un tubo corto de vidrio fino y se secó en atmósfera de nitrógeno a 60°C. Se disolvió el extracto seco en 1 ml de tampón de ensayo y se almacenó en nevera hasta que fue necesario (o puede congelarse).

[illegible] MADRID

- Se equilibran las disoluciones madre de reactivos a temperatura ambiente y se preparan las disoluciones de trabajo.

- Se preparan los patrones de cAMP en tubos de vidrio etiquetados como 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 fmol. Esto se consigue añadiendo 1 ml de tampón de ensayo a todos los tubos excepto el patrón de 512 fmol. Se añade entonces 1 ml de patrón de acetilación (10,24 pmol/ml) a los dos patrones superiores (256 y 512 fmol. Se agita con vórtice el patrón de 256 fmol y se transfiere 1 ml al patrón de 128 fmol. Esto se vuelve a hacer hasta el patrón de 2 fmol, en el que se dispone 1 ml de disolución. Se establece un tubo patrón cero que contiene 1 ml de tampón de ensayo.

- Se descongelan las muestras de extractos de tejidos en hielo (si es necesario) y se diluyen 1 a 100 (10 $\mu$l de muestra en 990 $\mu$l de tampón de ensayo) en tubos de vidrio etiquetados.

- Se acetila el cAMP en todos los patrones y muestras por adición de 100 $\mu$l de reactivo de acetilación, en campana de humos, que se añaden en un lado del tubo antes de la inmediata agitación con vórtice.

- Se añaden 50 $\mu$l de todos los patrones y muestras a los pocillos apropiados de la placa de 96 pocillos, y se añaden 150 $\mu$l de tampón de ensayo a los pocillos de unión no específica (NSB).

- Se añaden 100 µl de antisuero a todos los pocillos excepto los blancos (B) y NSB antes de incubar durante 2 horas a 3-5°C
- Después de la incubación, se añaden 100 µl de conjugado cAMP-peroxidasa a todos los pocillos excepto B antes de 1 hora más de incubación a 3-5°C.
- Se vacían las placas dándoles la vuelta y transfiriendo a un papel absorbente antes de lavar cada pocillo cuatro veces con 400 µl de tampón de lavado. Después de cada lavado se retransfieren las placas para asegurar que se extrae cualquier tampón de lavado residual. Se añaden inmediatamente entonces 200 µl de TMB a todos los pocillos.
- Se ponen las placas en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1 M en todos los pocillos. Se lee la densidad óptica en un Spectra max 190 a 450 nm durante 30 minutos.

## 4. PATRONES

Se establecen con cada ensayo los siguientes tubos patrones:

MADRID

### 4.1 Adición de un patrón en tampón de ensayo

Se añade una cantidad conocida de cAMP en tampón de ensayo para determinar la eficacia del ensayo. Se añaden 70 pmol/ml de cAMP al tampón de ensayo, que es equivalente a 35 fmol/pocillo en el ensayo, que está en la mitad de la curva de respuesta a la dosis.

Para preparar 1 ml de patrón: 68,4 $\mu$l de patrón 521 fmol/pocillo en 931,6 $\mu$l de tampón de ensayo

### 4. Efectos de los compuestos sobre la placa

Se establecen los patrones para determinar si el compuesto utilizado en los estudios funcionales tiene algún efecto sobre la placa de 96 pocillos o afecta a la unión de cAMP. Estos incluyen:

- Adición del compuesto en tampón de ensayo por separado para evaluar los efectos del compuesto directamente sobre la placa.
- Adición del compuesto en plasma que contiene niveles basales de cAMP para evaluar los efectos del compuesto sobre la unión de cAMP a la placa.

MADRID

496

Se añaden concentraciones 5 nM de compuesto en cada patrón. Se elige 5 nM porque los niveles de medicamento total al final de la infusión han sido en el pasado de aproximadamente 150-300 nM. Se diluyen las muestras 1:100 antes de ensayar, por lo tanto 5 nM permite concentraciones de medicamento mayores de las esperadas al final de la infusión.

## 5. CALCULOS

El lector de placas Spectra max lee la densidad óptica (DO) a 450 nm.

La curva patrón se genera por representación de $\%B/B_0$ (eje y) frente a fmol/pocillo de cAMP (eje x) en Spectra max.

$\%B/B_0$ (% unido) par cada muestra y se calcula el patrón como sigue:

$B_0$ = patrón cero (véase el procedimiento 3.2).

$$\%B/B_0 = \frac{(\text{DO de patrón o muestra-DO de NSB})}{(\text{DO de } B_0 \text{ - DO de NSB})} \times 100$$

El volumen fmol/pocillo puede leerse entonces directamente en la curva patrón para cada muestra. Entonces se

[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] MADRID

convierten los valores en pmol/ml antes de tomar la media de cada par de muestras.

Conversión de valores de fmol/pocillo a pmol/ml:

fmol a pmol = dividir entre 1000
volumen en pocillo = 50 µl ... (x1000)
50
La muestra se diluye 1/100, así que en conjunto = 1 x 1000/1000 x 100/50 = 2

Así que todos los valores de fmol/pocillo se multiplican por 2 para dar pmol/ml.

MODELO DE ENSAYO ANIMAL

LA POTENCIACION DE LOS EFECTOS DEL 3'-5'-MONOFOSFATO DE ADENOSINA CICLICO DA COMO RESULTADO AUMENTOS EN EL FLUJO SANGUINEO VAGINAL EN EL MODELO DE CONEJO ANESTESIADO DE EXCITACION SEXUAL.

1.0 Objetivos

1. Desarrollar y validar un modelo animal de excitación sexual femenina.

MADRID

2. Identificar el (los) mecanismo(s) responsable(s) de la regulación del flujo sanguíneo genital en conejo anestesiado.
3. Identificar los enfoques potenciales para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal.
4. Investigar el(los) mecanismo(s) que subyacen en la relajación del músculo liso vaginal e identificar los enfoques potenciales para la estimulación de la relajación vaginal.

## 2.0 Introducción

La respuesta de excitación sexual normal consiste en una serie de respuestas fisiológicas que se observan durante la excitación sexual. Estos cambios, como congestión vaginal, labial y clitórica dan como resultado aumentos en el flujo sanguíneo genital. La congestión conduce a un aumento de la lubricación a través de la trasudación de plasma, aumento de la flexibilidad vaginal (relajación del músculo liso vaginal) y aumento de la sensibilidad vaginal y clitórica.

El trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) es un trastorno sexual altamente prevalente que afecta a mujeres pre, peri y postmenopáusicas (±HRT). La consecuencia

[illegible] MORENO [illegible] MADRID

primaria del FSAD es la falta de congestión o esponjamiento, que se manifiesta como falta de lubricación vaginal y falta de sensación genital placentera. Las consecuencias secundarias incluyen una reducción del deseo sexual, dolor durante el coito y dificultades para conseguir un orgasmo. La causa más común de FSAD es una reducción del flujo sanguíneo genital resultante en una reducción de la congestión vaginal, labial y clitórica. (Park 1997, Goldstein 1998, Berman 1999a, Werbin 1999).

Como se ha explicado en la presente, la presente invención proporciona un medio para restablecer o imitar la respuesta de excitación sexual normal en mujeres que sufren FSAD por estimulación del flujo sanguíneo genital.

En nuestros estudios hemos identificado a cAMP (3',5'-monofosfato de adenosina cíclico) como un mediador de la vasorrelajación vaginal utilizando tecnología de láser Doppler para medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo genital. Esto ha implicado desarrollar un modelo animal de excitación sexual y demostrar que los datos imitan los cambios fisiológicos observados durante la excitación sexual femenina. El modelo se ha utilizado entonces para identificar y validar mecanismos que estimulen el flujo sanguíneo genital, por ejemplo por potenciación directa o

MADRID

indirecta de la vasorrelajación mediada por cAMP.

## 3.0 Procedimientos

### 3.1 *Protocolo anestésico*

Se premedicaron conejos hembra de Nueva Zelanda (alrededor de 2,5 kg) con una combinación de Medetomidine (Dormitor$^{(R)}$) 0,5 ml/kg intramuscular, y Ketamine (Vetalar$^{(R)}$) 0,25 ml/kg intramuscular manteniendo la toma de oxígeno con una mascarilla facial. Se traqueotomizaron los conejos utilizando un tubo endotraqueal sin boquilla Portex™ 3ID conectado a un ventilador y se mantuvieron a una tasa de ventilación de 30-40 respiraciones por minuto, con un volumen motriz aproximado de 18-20 ml y una presión máxima en las vías aéreas de 10 cm de $H_2O$. Se cambió entonces la anestesia a Isoflurane y siguió la ventilación con $O_2$ a 2 l/min. Se canuló la vena marginal de la oreja derecha utilizando un catéter 23G o 24G y se perfundió una disolución Ringer lactatada a 0,5 ml/min. Se mantuvo el conejo con Isoflurane al 3% durante la cirugía invasiva, bajando a 2% para anestesia de mantenimiento.

### 3.2 *Canulación de vasos*

Se afeitó el área de la ingle izquierda del conejo y se realizó una incisión vertical de aproximadamente 5 cm de longitud a lo largo del muslo. Se expusieron la vena y arteria femoral, se aislaron y se canularon con un catéter de PVC (17G) para la infusión de medicamentos y compuestos. Se repitió la canulación para la arteria femoral, insertando el catéter a una profundidad de 10 cm para asegurar que el catéter alcanzaba la aorta abdominal. Se ligó el catéter arterial a un sistema Gould para registrar la presión sanguínea. Se tomaron muestras para análisis de gases en sangre a través del catéter arterial. Se midieron las presiones sistólica y diastólica y se calculó la presión arterial media utilizando la fórmula (diastólica x 2 + sistólica) + 3. Se midió el ritmo cardiaco mediante oxímetro de pulsos y el sistema de software de adquisición de datos Po-ne-mah (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems Inc).

### 3.3 *Estimulación del nervio pélvico*

Se realizó una incisión ventral de línea media en la cavidad abdominal. La incisión fue de unos 5 cm de longitud justo por encima del pubis. La grasa y el músculo se apartaron directamente para revelar el nervio hipogástrico que recorre la cavidad corporal. Era esencial mantenerse

MADRID

cerca del lado curvo de la pared del pubis para evitar dañar la vena y arteria femoral que se encuentran por encima del pubis. Los nervios ciático y pélvico se encuentran más profundos y fueron localizados después de más extracción del lado dorsal del conejo. Una vez se identificó el nervio ciático, se localizó fácilmente el nervio pélvico. Encontramos que la estimulación del nervio produce un aumento del flujo sanguíneo vaginal y la inervación de la región pélvica. El nervio pélvico se liberó del tejido circundante y se colocó un electrodo estimulante Harvard dipolar alrededor del nervio. Se levantó ligeramente el nervio para proporcionar algo de tensión, después se aseguró el electrodo en la posición. Se colocó aproximadamente 1 ml de aceite de parafina ligera alrededor del nervio y el electrodo. Esto actúa como lubricante protector para el nervio y previene la contaminación de la sangre con el electrodo. Se conectó el electrodo a un estimulador Grass S88. Se estimuló el nervio pélvico utilizando los siguientes parámetros: 20V, anchura del pulso 0,5 ms, duración del estímulo 10 segundos e intervalo de frecuencia de 2 a 15 Hz. Se obtuvieron respuestas reproducibles cuando se estimuló el nervio cada 15-20 minutos.

Se determinó una curva de respuesta a la frecuencia al inicio de cada experimento para determinar la frecuencia óptima para usar como respuesta submáxima, normalmente 4 Hz. El(los) compuesto(s) a ensayar se infundieron, a través de la vena femoral, utilizando una bomba de infusión Harvard 22, permitiendo un ciclo de estimulación continuo de 15 minutos.

### 3.4 *Posicionado de las sondas de láser Doppler*

Se realizó una incición ventral de línea media en el extremo caudal del pubis para exponer el área púbica. Se expuso la pared vaginal externa por eliminación del tejido conectivo. Se insertó una sonda de flujo de láser Doppler 3 cm en la vagina, de modo que el eje de la sonda siguiera visible. Se ajustó entonces la posición de estas sondas hasta obtener una señal. Se colocó una segunda sonda justo por encima de la superficie de un vaso sanguíneo de la pared externa vaginal. Ambas sondas se sujetaron en la posición.

Se registró el flujo sanguíneo vaginal directamente como números a partir del medidor de flujo utilizando el software de adquisición de datos Po-ne-mah (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument System Inc.), o indirectamente de la señal del registro gráfico Gould. Se fijó la calibración al inicio del experimento (0-62,5 ml/min/100 g tejido).

### 3.5 *Infusión de péptido intestinal vasoactivo (VIP)*

Las dosis de VIP (Bachem, H-3775) infundidas fueron 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 µg/kg intravenosas y se infundieron en un volumen de 0,5 ml de suero salino. VIP se infundió utilizando una bomba Harvard 22, infundiendo a 500 µl/min a través de una llave de tres vías en la vena femoral. Después de la infusión de VIP, se lavó el catéter con suero salino heparinizado (Hepsaline) de modo que no quedara VIP en el catéter.

Para experimentos que utilizan infusiones de VIP, había la necesidad de una dosis inicial de sensibilización (10 nM), para poder obtener respuestas reproducibles. Se infundió una infusión inicial de Hepsaline (50 UI/ml) para actuar como control negativo.

### 3.6 *Infusión de inhibidores*

Se prepararon inhibidores de NEP (endopeptidasa neutral EC3.4.24.11), inhibidores de fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE5) e inhibidores de PDE2 en suero salino o disolución

[illegible] - MADRID

de glucosa al 5% (200 µl de glucosa al 50% en 1,8 ml de agua para inyecciones). Los inhibidores se infundieron a la misma velocidad que VIP. Los inhibidores de NEP se dejaron durante 30 minutos antes de la curva de respuesta a la dosis de VIP, mientras que los inhibidores de PDE5 y PDE2 se dejaron durante 15 minutos.

### 3.7 *Medida de la relajación del músculo liso en vagina de conejo aislada*

3.7 (a). Preparación de vagina de conejo in vitro: Se sacrificaron conejos blancos hembras de Nueva Zelanda (2,0-3,0 kg) por dislocación cervical. Se abrió la cavidad abdominal y se extrajo la vagina. Se montaron longitudinalmente bandas de tejido en cámaras de órganos silanizadas de 5 ml de Wesley Co. con suturas de seda trenzada (calibre 6/0) a una tensión en reposo inicial de 1,5 kg en tampón bicarbonato de Krebs mantenido a 37°C y gasificado con 95% $O_2$/5% $CO_2$. Se unió la ligadura superior de cada banda de tejido a un transductor de desplazamiento de fuerza de 10 g de capacidad y se midieron y registraron los cambios en la fuerza isométrica utilizando un sistema de captura de datos in vitro DART. Se dejaron equilibrar los tejidos durante 1,5 horas y se lavaron regularmente con Krebs.

3.7 (b). Relajación inducida por el péptido intestinal vasoactivo en vagina de conejo: Se contrajo cada tejido utilizando una concentración de baño 1 µM de fenilefrina. Cuando la respuesta contráctil alcanzó una meseta estable (alrededor de 15 minutos), se añadió acumulativamente VIP a la cámara de órganos en unidades logarítmicas para producir concentraciones de 0,1 a 100 nM. Se midieron las respuestas de relajación 5 minutos después de la adición de cada concentración de VIP, consiguiéndose la máxima relajación en ese momento. Después los tejidos recibieron un agente de ensayo (por ejemplo inhibidor de NEP o PDE) o el vehículo DMSO (control de tiempo coincidente).

3.7 (c). Análisis de datos para experimentos de relajación por VIP: Para cada curva de respuesta concentración de VIP-relajación, se expresaron las respuestas de relajación inducidas por VIP como porcentaje de la contracción máxima inducida por fenilefrina. Estos valores se representaron entonces frente al logaritmo de la concentración de VIP y se ajustaron a curvas sigmoideas. Con fines de ajuste de curvas, se limitó la respuesta de relajación mínima al 0% y se dejó ajustar libremente la máxima respuesta de relajación. Se determinó la concentración de VIP requerida para producir una relajación del 50% de la contracción de fenilefrina ($CE_{50\,PE}$).

PATRICIA ... MORENO
INGLES ...
... MADRID
Teléf. 51...

3.7 (d). Relajación estimulada por el campo eléctrico de vagina de conejo: Se prepararon las bandas vaginales de conejo como se ha descrito en la sección 3.7 (a). Se montaron las bandas de tejido entre dos electrodos de platino situados en la parte superior e inferior de la cámara de órganos, apartados unos 4 cm. Cada tejido se contrajo utilizando una concentración de baño 1 µM de fenilefrina. Cuando la respuesta contráctil alcanzó una meseta estable (15 minutos), los tejidos experimentaron un pretratamiento de curva de relajación inducida estimulada por campo eléctrico (EFS). Este se realizó a entre 40-60 voltios utilizando frecuencias secuenciales de 2, 4, 8 y 16 Hz suministradas como trenes de 10 segundos de anchura de pulso de 0,5 ms. Se dejaron volver los tejidos a la línea base de tensión precontráctil entre cada frecuencia (5 minutos) y se registró el tamaño de la respuesta de relajación.

Después de terminar el pretratamiento de curva de respuesta a EFS, se lavaron todos los tejidos durante 15 minutos, dejando a los tejidos volver a la tensión de línea base. Entonces los tejidos recibieron un agente de ensayo (por ejemplo inhibidor de NEP o PDE, inhibidor de sintasa de óxido nítrico (NOS)) o vehículo DMSO (control de tiempo coincidente). Se recontrajeron los tejidos con fenilefrina

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 13
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

(1 µM) 15 minutos después de la adición del compuesto o vehículo y se determinó una curva de respuesta de relajación inducida por EFS como se ha descrito anteriormente.

Para los experimentos EFS, se complementó el medio Krebs con atropina (10 µM) y guanetidina (150 µM) para eliminar cualquier inervación colinérgica o adrenérgica de la vagina.

### 3.8 *Medida de los niveles de cAMP en vagina de conejo aislada*

Se realizó la medida de las concentraciones de cAMP a partir de extractos de tejido vaginal utilizando un estuche de inmunoensayo enzimático (EIA) de cAMP Biotrak (Amersham Life Sciences, RPN 225). Se trataron las muestras de tejido vaginal aislado con agentes de ensayo (por ejemplo forskolina o VIP). Después de 5 minutos, se congelaron inmediatamente las muestras utilizando nitrógeno líquido, se homogeneizaron y se extrajo el cAMP. Se miden los niveles de cAMP por EIA. El EIA está basado en la competición entre cAMP sin marcar y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa para una cantidad limitada de anticuerpo específico de cAMP.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES [illegible]
c. [illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

### 3.9 *Medida de la actividad fosfodiesterasa (PDE) en vagina de conejo aislada*

Se obtuvieron extractos de citosol de pared vaginal humana de ABS Inc., Delaware (edad de las donantes de 41 a 60 años). Se separaron las isoenzimas PDE por cromatografía de intercambio aniónico Mono-Q y se caracterizaron basándose en su selectividad de sustrato, sensibilidad a moduladores alostéricos e inhibidores selectivos. También se realizaron análisis Western utilizando anticuerpos de isoenzimas específicas de PDE para detectar la expresión de PDE en la vagina humana.

Todos los datos se comunican como media ± s.e.m. Los cambios significativos se identificaron utilizando ensayos de t de Student.

## 4.0 Resultados y Discusión

### 4.1 *Modelo animal de excitación sexual*

En nuestros estudios, hemos desarrollado un modelo reproducible y robusto de la fisiología de la excitación sexual. Utilizando este modelo de conejo anestesiado, somos capaces de medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MAN
3
[illegible] MADRID
Tel.

genital utilizando tecnología de láser Doppler. La estimulación del nervio pélvico se utiliza para simular los efectos neuronales de la excitación sexual.

Encontramos que la estimulación del nervio pélvico inducía aumentos dependientes de la frecuencia en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 1). Estos aumentos son significativos cuando se registran en la pared intra o extravaginal. La estimulación del nervio pélvico a 2Hz indujo una elevación del flujo sanguíneo vaginal máximo media de 10,3 ± 1,8, a 4 Hz 20,0 ± 4,6, a 8 Hz 36,3 ± 4,8 y a 16 Hz 46,6 ± 4,7 ml/min/100 g de tejido (n= 4), 15-20 V, 0,5 ms, 10 s). Estos valores son de amplitud similar a los observados anteriormente en estudios humanos y modelos animales de excitación (Berman 1999a, Park 1997).

Encontramos que la estimulación submáxima del nervio pélvico da como resultado aumentos reproducibles en el flujo sanguíneo genital (por ejemplo la estimulación con 4 Hz cada 15 minutos proporcionó un aumento medio de 8,50 ± 0,10 ml/min/100 g de tejido, n= 8). Esta reproducibilidad se mantiene durante hasta 5 horas. Podemos utilizar la reproductibilidad de estas respuestas para investigar a) la identidad de los agentes/mecanismos vasoactivos endógenos que median la congestión genital y b) la

PATRICIA [illegible] MORENO [illegible] MADRID

influencia de los medicamentos que pueden ser eficaces en la estimulación del flujo sanguíneo vaginal.

Encontramos que no hay efectos cardiovasculares adversos asociados con la estimulación del nervio pélvico en el conejo anestesiado (véase la figura 3).

El flujo sanguíneo vaginal aumenta durante la excitación sexual (Berman, 1999) a través de un aumento del suministro de sangre arterial, la arteria vaginal, la rama vaginal de la arteria uterina, la arteria genital interna y las ramas medias de la arteria media rectal están todas implicadas en el suministro de sangre a la vagina y el clítoris. El nervio pélvico, que se origina en las regiones espinales S2/S4, inerva laa vagina inferior y vasos sanguíneos relacionados. Mediante la estimulación del nervio pélvico, podemos simular los efectos sobre el flujo sanguíneo observados durante la excitación sexual, es decir, un aumento en el flujo sanguíneo vaginal arterial. De forma interesante, el aumento de flujo sanguíneo arterial no se ve reflejado por un vaciado venoso que permita a las redes capilares congestionarse con la sangre. La congestión vaginal conduce a la lubricación vaginal a través de trasudación de plasma y esta es una de las primeras respuestas pélvicas observadas durante la estimulación

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS [illegible]
[illegible] MADRID

sexual. Los neurotransmisores que se liberan con la estimulación del nervio pélvico o durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. Los nervios que contienen los neuropéptidos y otros candidatos a neurotransmisores que inervan la vasculatura y microvasculatura de la vagina y clíoris, han sido identificados inmunohistoquímicamente. Estos estudios indican que el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), el neuropéptido Y (NPY), la sintasa de óxido nítrico (NOS), la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) están todos presentes en los nervios que inervan la vagina y clítoris humanos. (Hoyle, 1996).

### 4.2 *Validación del modelo de conejo anestesiado de excitación sexual*

Para traducir los datos de flujo sanguíneo generados utilizando este modelo a los observados en un modelo humano de excitación sexual, comparamos directamente nuestros datos con datos de flujo sanguíneo vaginal y cardiovasculares generados en estudios preclínicos.

Encontramos que la infusión de VIP tiene los siguientes efectos en el modelo de conejo de excitación sexual:

PATRICIA [illegible] MORENO
ING. [illegible] AN
C [illegible] 13
Tel. [illegible] MADRID

- El VIP exógeno (bolo intravenoso) induce aumentos dependientes de la concentración significativos en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2a). Estos aumentos son significativamente elevados por encima de los valores de flujo sanguíneo basal cuando se registran en la pared intra o extravaginal. El flujo sanguíneo vaginal aumentó significaticamente en 24,7 ± 3,6 ml/min/100 g de tejido con una administración intravenosa de VIP (3 μg/kg). El flujo sanguíneo permaneció elevado por encima del basal durante alrededor de 11 minutos después de la infusión. Dosis menores indujeron aumentos menores, por ejemplo 0,3 μg/kg elevaron el flujo sanguíneo en 7,5 ± 1,3 ml/min/100 g de tejido y el flujo sanguíneo se elevó durante 7 minutos después de la infusión.

- Las infusiones repetidas de dosis similares de VIP (intravenoso en intervalos de 30 minutos) inducen aumentos reproducibles significativos en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b).

- El VIP (intravenoso) aumenta significativamente el ritmo cardiaco y reduce la presión sanguínea arterial media (véase la figura 3). A 0,3 μg/kg de VIP (intravenoso) se produjo una reducción significativa en la presión sanguínea arterial media de 13,2 ± 0,7 mm Hg y un aumento

MORENO
113
Telé

significativo en el ritmo cardiaco de 16 ± 4 latidos por minuto.

Este modelo animal refleja directamente los datos clínicos, es decir, aumento en el flujo sanguíneo vaginal, presión sanguínea deprimida y ritmo cardiaco elevado. Por lo tanto, este modelo puede utilizarse para investigar el (los) mecanismo(s) que subyace(n) en los cambios fisiológicos que aparecen durante la excitación sexual y además validar los nuevos enfoques para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal y por ello del tratamiento de FSAD.

### 4.3 *VIP induce cambios en el flujo sanguíneo vaginal mediante la estimulación de la ruta cAMP/adeniato ciclasa*

Ottesen y colaboradores demostraron que el VIP induce aumentos en el flujo sanguíneo vaginal y en la lubricación en voluntarias sanas. Sin embargo, el mecanismo por el que VIP ejerce este efecto no está claro. En la literatura hay muchos ejemplos de señalización de VIP mediante diferentes segundos mensajeros, incluyendo cGMP/guanilato ciclasa (Ashur-Fabian, 1999), monóxido de carbono/oxigenasa hemo (Fan, 1998) y cAMP/adenilato ciclasa (Schoeffer, 1985, Gu, 1992, Foda, 1995). Esto se ejemplifica por un reciente artículo que describe cómo los efectos relajantes de VIP

MORENO
MADRID
Telé.

en la arteria uterina pueden explicarse por la liberación de óxido nítrico (Jovanovic, 1998). De forma interesante, existen también evidencias de que NO/cGMP modula VIP en la función urogenital masculina (Kim, 1994).

En este estudio hemos mostrado que el VIP induce la vasorrelajación mediante la elevación de los niveles de cAMP intracelular. Realizando una serie de experimentos funcionales hemos medido el flujo sanguíneo y la relajación del músculo liso además de medir bioquímicamente las concentraciones de cAMP intracelular. Hemos utilizado forskolina, un activador de adenilato ciclasa o mimético de cAMP, para imitar los efectos de la activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa. VIP y forskolina tienen efectos idénticos sobre los efectos fisiológicos de la excitación sobre el flujo sanguíneo vaginal y la relajación.

VIP (1 µg/kg) y forskolina (40 nmol/kg) inducen aumentos significativos en el flujo sanguíneo vaginal, 13,2 y 12,7 ml/min/100 mg de tejido respectivamente (véase las figuras 2a y 4a). Estos cambios en la amplitud inducida por VIP y forskolina no eran significativamente diferentes. Estos aumentos son significativamente elevados por encima de los valores de flujo sanguíneo basal registrados en la pared

PATRICIA KRAH MORENO
ING. ES Y ALEMAN
MADRID

516 577

intra o extravaginal.

VIP (0,1 µM) y forskolina (10 µM) aumentaron ambos significativamente las concentraciones intracelulares de cAMP por encima de los niveles basales en tejido vaginal aislado (véase la figura 4b).

VIP (0,1 µM) y forskolina (10 µM) elevan las concentraciones basales de 276 nM en un 156% y 238%, respectivamente. Las diferencias en estos porcentajes reflejan la diferencia de concentraciones de VIP y forskolina utilizados, por ejemplo VIP a una concentración de 0,1 µM relaja la vagina aislada precontraída alrededor de un 80%, mientras que forskolina 10 µM es suficiente para relajar completamente el tejido aislado.

Además mostramos que VIP y forskolina inducen la relajación en tejido vaginal aislado con valores de $CE_{50}$ de 18,6 ± 0,6 nM y 320 ± 20 nM respectivamente (véase la figura 4c).

Estos datos establecen que VIP induce la vasorrelajación vaginal a través de la ruta cAMP/adenilato ciclasa, por ello este modelo puede utilizarse para investigar si la estimulación del nervio pélvico, es decir la excitación sexual, conduce a la liberación de VIP/activación de la

PATRICIA [illegible] MORENO

ruta cAMP/adenilato ciclasa. Además, pueden investigarse los enfoques para estimular el flujo sanguíneo vaginal durante la excitación sexual, por ejemplo estimulando directa o indirectamente la señalización de cAMP.

### 4.4 *cAMP es el mediador de la vasorrelajación vaginal*

Los candidatos a neurotransmisor y segundo mensajero responsables de los aumentos en el flujo sanguíneo vaginal durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. Hasta la fecha, los investigadores se han centrado en la ruta del óxido nítrico (NO)/cGMP. Según la presente invención, hemos demostrado que: 1) la ruta cGMP/adenilato ciclasa media los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo vaginal. 2) VIP es un neurotransmisor endógeno liberado durante la excitación sexual y 3) el VIP liberado endógenamente induce efectos vasorrelajantes mediante la elevación de cAMP.

Los agentes útiles en la presente invención son aquellos que evitan el metabolismo de VIP o que estimulan directamente la señalización de cAMP, estimulan los aumentos estimulados por nervio pélvico en el flujo sanguíneo vaginal, por ejemplo inhibidores de NEP o inhibidores de $PDE_{cAMP}$, respectivamente (véase la siguiente

[illegible] MORENO
[illegible] RID

sección).

En nuestros estudios hemos encontrado que creemos que podemos excluir el papel del NO en la relajación vaginal inducida por VIP. A este respecto, hemos mostrado que un potente y selectivo inhibidor de PDE de tipo 5 no tiene efecto sobre los aumentos estimulados por nervio pélvico o inducidos por VIP en el flujo sanguíneo vaginal (-5,3 ± 5,5% de cambio en el flujo sanguíneo a 60 μg/kg). Además, el inhibidor de PDE de tipo 5 tiene un efecto mínimo sobre las relajaciones inducidas por VIP o estimuladas por campo eléctrico (EFS) de músculo liso vaginal aislado (estimulaciones del 30% de relajaciones inducidas por VIP, véase la tabla 1).

Tabla 1: Estimulación de la relajación mediada por VIP de vagina de conejo aislada. Esta tabla ilustra el porcentaje de estimulación de la $CE_{50}$ para relajaciones mediadas por VIP de músculo liso vaginal precontraído (1 μM de fenilefrina). Los inhibidores selectivos de $PDE_{cAMP}$ de tipos 1, 2, 3 y 4 potenciaron todos significativamente las relajaciones mediadas por VIP, mientras que un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 5 o control de vehículo no tuvieron efecto sobre las relajaciones mediadas por VIP.

[illegible] MORENO
[illegible]MAN
[illegible] RID

519

| Inhibidor de PDE a dosis selectiva | Porcentaje de estimulación de la relajación inducida por VIP |
|---|---|
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 1 | 210% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 | 130% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 3 | 220% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 4 | 160% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 5 | Sin efecto (30%) |
| Control de vehículo | Sin efecto |

Hemos mostrado que VIP es el también el neurotransmisor endógeno NANC (no adrenérgico, no colinérgico) parcialmente responsable de las relajaciones inducidas por EFS de músculo liso vaginal aislado. Una dosis elevada de inhibidor de sintasa de óxido nítrico (L-NOARG, 300 µM) inhibe sólo el 50% de las relajaciones inducidas por EFS. Un inhibidor de NEP (1 µM) que evitará el metabolismo de VIP inducido por NEP, y por lo tanto estimula la señalización de VIP, estimula la relajación NANC, que no es de óxido nítrico, inducida por EFS. Hemos mostrado que tanto NO como VIP regulan el tono del músculo liso en la pared vaginal. Terapéuticamente será posible estimular las relajaciones del músculo liso vaginal con agentes que

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] RID
Tel.

estimulan la señalización mediada por NO/cGMP y/o VIP/cAMP.

4.5 *El flujo sanguíneo vaginal es estimulado por agentes farmacológicos que elevan directa o indirectamente los niveles de cAMP.*

FSAD está asociado con, y puede dar como resultado, una reducción del flujo sanguíneo genital. Los enfoques potenciales para tratar esta enfermedad giran alrededor de la estimulación del flujo sanguíneo genital. Habiendo establecido que cAMP es el mediador dela vasorrelajación genital y que las elevaciones de cAMP resultan de VIP liberado neuronalmente, creemos que si se estimula la señalización de cAMP, como consecuencia aumentará el flujo sanguíneo genital, restableciendo así el flujo sanguíneo genital a niveles normales y tratando el FSAD. Hemos elegido inicialmente tres objetivos para estimular directa o indirectamente la vasorrelajación mediada por cAMP: los inhibidores de $PDE_{cAMP}$, inhibidores de NEP (EC 3.4.24.11) y antagonistas de receptor de neuropéptido Y (NPY).

4.5.1 Inhibidores de endopeptidasa neutra (NEP EC 3.4.24.11)

La NEP EC 3.4.24.11 metaboliza VIP y por ello finaliza la

MORENO
Y ALEMAN
113
MADRID

actividad biológica mediada por VIP. Los inhibidores de NEP potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del VIP liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión genital.

No ha habido informes previos en la literatura sobre la localización de NE EC 3.4.24.11 o de su papel funcional en tejido vaginal o su papel en la excitación sexual.

Los inhibidores selectivos de NE EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes estimulan significativamente los aumentos estimulados por nervio pélvico en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 5).

Un inhibidor de NEP estimulaba el aumento de pico en el flujo sanguíneo vaginal hasta un 53% comparado con los aumentos control de tiempo coincidente. Esta estimulación de las frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4 Hz), era dependiente de la dosis, por ejemplo 0,1 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 35,0 ± 7,6%, 0,3 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 42,6 ± 27,7% y 1,0 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 52,8 ± 32,5%. Los inhibidores de NEP no tuvieron efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (sin estimular). Por ello, los agentes de la presente invención estimulan la excitación

MORENO
MADRID

potenciando la señalización de cAMP, más que induciendo la excitación en ausencia de deseo sexual, es decir por aumento directo de la señalización de cAMP.

Los inhibidores selectivos de NE EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes estimulan significativamente los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo vaginal comparados con los controles de tiempo coincidente. A dosis submáximas de VIP (por ejemplo 0,3 μg/kg) hay una potenciación significativa en tanto el aumento de pico (95 ± 6%) como en la prolongación de la duración de la estimulación (alrededor de 140%, desde 7 hasta más de 17 minutos, véase la figura 7). Los inhibidores de NEP prolongan significativamente la duración de la elevación inducida por VIP en el flujo sanguíneo vaginal cuando se proporcionan en combinación con una dosis de VIP que produce los aumentos de flujo máximos (alrededor de un 80% de aumento en una duración de 11 a 20 minutos).

Los inhibidores de NEP a dosis clínicamente relevantes estimulan significativamente las relajaciones inducidas por VIP y mediadas por nervio en tejido aislado. La $CE_{50}$ de VIP se reduce significativamente de 18,8 ± 0,6 nM a 2,9 ± 0,3 nM en presencia de un inhibidor selectivo de NEP (1 μM). El efecto del inhibidor de NEP es dependiente de la

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] ALEMAN
[illegible] 113
MADRID
Tel.

concentración.

Se expresan el RNA mensajero y proteína de NEP EC 3.4.24.11 y se han identificado en vagina humana y de conejo por análisis Northern y Western.

### 4.5.2 Inhibidores de fosfodiesterasa (PDE)

cAMP se degrada por PDE hidrolizante de cAMP, es decir, $PDE_{cAMP}$. Los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del cAMP liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No hay informes en la literatura sobre la localización de $PDE_{cAMP}$ o sobre un papel funcional de estas isozimas en tejido vaginal, o de un papel en la excitación sexual. Hemos mostrado, por perfiles de PDE de vagina humana y de conejo, que están presentes las siguientes isozimas de $PDE_{cAMP}$ 1, 2, 3, 4, 7 y 8. Los inhibidores de estas $PDE_{cAMP}$ representan agentes potenciales para estimular el flujo sanguíneo vaginal y/o relajar el músculo liso vaginal.

Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 a dosis clínicamente relevantes estimuló significativamente la

PATRICIA VIGIL MORENO
INGLES Y ALEMAN
MADRID

duración de los aumentos estimulados por nervio pélvico en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 7). El inhibidor selectivo de PDE$_{cAMP}$ de tipo 2 (500 µg/kg, iv) estimuló el aumento de pico en el flujo sanguíneo vaginal en un 86,9 ± 21,9%, comparado con los controles de tiempo coincidente @ 4Hz).

Los inhibidores de PDE$_{cAMP}$ estimulan las relajaciones inducidas por VIP de músculo liso vaginal aislado precontraído (1 µM de fenilefrina, véase la tabla 1). Los inhibidores selectivos de PCE$_{cAMP}$ de tipos 1, 2, 3 y 4 potenciaban todos significativamente las relajaciones mediadas por VIP (210% @76 nM, 130% @ 8 nM, 220% @ 3,4 µM y 160% @ 686 nM de potenciación de los valores de CE$_{50}$). Estos inhibidores se administraron a dosis que se sabían selectivas para el PDE$_{cAMP}$ de interés. El inhibidor selectivo de PDE$_{cAMP}$ de tipo 5 o control de vehículo no tenían un efecto viable en las relajaciones mediadas por VIP.

### 4.5.3 Antagonistas de receptor de NPY Y1

NPY ejerce una influencia inhibitoria sobre la vasorrelajación mediada por VIP y los antagonistas de receptor de NPY Y1 facilitarán el efecto vasorrelajante del

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
MADRID

VIP endógeno liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No existen informes en la literatura sobre la localización del receptor de NPY o de un papel funcional para estos receptores en tejido vaginal o un papel en la excitación sexual.

Los estudios de expresión del receptor de NPY han identificado por análisis Northern y Western que los subtipos de receptor NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$ están presentes en vagina humana y de conejo.

### 4.6 *Efectos de los agentes que estimulan cAMP o aumentan el flujo sanguíneo vaginal sobre la presión sanguínea arterial media en conejo anestesiado.*

En la búsqueda de una terapia oral para FSAD, es deseable que no haya efectos cardiovasculares adversos asociados, por ejemplo efectos sobre la presión sanguínea o ritmo cardiaco. En nuestros estudios, hemos encontrado que las infusiones de VIP reducen significativamente la presión sanguínea arterial media (véase la figura 3) y aumentan significativamente el ritmo cardiaco. Por ello, en un agente altamente preferido, el agente no es VIP. La

PAT[illegible] ROCH MORENO
INGLES Y [illegible]
[illegible] MADRID

estimulación del nervio pélvico y los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ y NEP, sin embargo, no tuvieron efecto sobre la presión sanguínea. A 0,3 µg/kg (intravenoso), VIP produjo un aumento significativo en el ritmo cardiaco de 16 ± 4 latidos por minuto. A dosis mayores como 3,0 µg/kg (intravenoso), VIP produjo una reducción significativa en la presión sanguínea arterial media de 14,7 ± 1,37 mm Hg y esto se asoció con un aumento significativo en el ritmo cardiaco de 111 ± 30 latidos por minuto, que aumentó entonces la presión sanguínea arterial media en 8,5 ± 1,4 mm Hg.

COMPUESTOS ENSAYADOS

La figura 8 presenta una serie compuestos que se ensayaron según la presente invención y se encontraron eficaces según la presente invención, es decir, pueden actuar como $P_{cAMP}$ para tratar FSD, en particular FSAD.

Más detalladamente:

El compuesto de fórmula Ia ("FIa") es 5-[4-(dietilamino)bencil]-1-metil-3-propil-6,7-dihidro-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona. FIa puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0911333 (ejemplo 50

MORENO
LEMAN
113
RID

de éste).

El compuesto de fórmula II ("FII") es 9-(1-acetil-4-feinlbutil)-2-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona. FII puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0771799 (ejemplo 100 de éste).

El compuesto de fórmula III ("FIII") es Milrinone. FIII es un producto comercialmente disponible.

El compuesto de fórmula IV ("FIV") es Rolipram. FIV es un producto comercialmente disponible.

El compuesto de fórmula V ("FV") es éster 3-[[[1-(2-carboxi-4-pentenil)ciclopentil]carbonil]amino]-1-etílico del ácido ciclohexanocarboxílico. FV puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0274234 (ejemplo 300 de éste).

El compuesto de fórmula VI ("FVI") es éster 3-[[[1-(2-carboxi-4-pentenil)ciclopentil]carbonil]amino]-??? del ácido ciclohexanocarboxílico. FVI puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0274234 (ejemplo 379 de éste).

MORENO
Y ALEMAN
MADRID

En particular, FIa, FII, FIII y FIV son inhibidores de $PDE_{cAMP}$. FIa es un I:PDEI, FII es un I:PDEII, FIII es un I:PDEIII y FIV es un I:PDEIV.

Los datos para estos compuestos se presentan anteriormente en las secciones de ejemplos anteriores, por ejemplo véase la tabla 1.

Como resulta evidente, estos inhibidores de $PDE_{cAMP}$ estimulan las relajaciones inducidas por VIP de tejido aislado.

FII, que es un I:PDEII selectivo, estimula los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relevantes.

FII estimula también los aumentos estimulados por nervio pélvico en flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

FV y FVI son inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11.

Los datos presentados anteriormente en las secciones de ejemplos anteriores son para FVI. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares para FV.

PATRICIA [illegible] MORENO

Como resulta evidente, FV y FVI estimulan los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

FV y FVI estimulan también los aumentos estimulados por nervio pélvico en el flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

FV y FVI estimulan también las relajaciones inducidas por VIP y mediadas por nervio de tejido aislado a dosis clínicamente relevantes.

## CONCLUSIONES

Hemos desarrollado un modelo animal que imita la respuesta de excitación fisiológica observada durante la excitación sexual femenina y que refleja directamente los datos clínicos obtenidos en voluntarias humanas. El modelo utiliza tecnologías de láser Doppler para registrar pequeños cambios en el flujo sanguíneo vaginal inducidos por la estimulación del nervio pélvico o por neurotransmisores vasoactivos. Durante la excitación sexual, existe un aumento en el flujo sanguíneo genital resultante del aumento de inervación por el nervio pélvico.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] Y [illegible] MAN
[illegible] RID
Telf. [illegible]

El aumento estimulado por nervio pélvico en el flujo sanguíneo vaginal observado en el modelo animal representa los efectos vasculares endógenos observados durante la excitación sexual femenina. Por lo tanto, este modelo puede utilizarse en primer lugar para identificar los mecanismos implicados en la regulación del flujo sanguíneo vaginal y, en segundo lugar, para validar nuevos enfoques para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal.

Este estudio ha utilizado exitosamente una combinación de técnicas in vivo, in vitro y bioquímicas para identificar a cAMP como el mediador/segundo mensajero que regula la vasorrelajación vaginal (y la relajación de la pared vaginal). Utilizando este modelo animal, hemos demostrado que los aumentos en el flujo sanguíneo vaginal mediados por VIP son el resultado de la elevación del cAMP del tejido, mientras que anteriormente se había mostrado que VIP aumentaba el flujo sanguíneo vaginal en voluntarias sanas, pero el mecanismo celular no estaba identificado. Además, hemos demostrado que el flujo sanguíneo vaginal puede estimularse directamente con un mimético de cAMP o indirectamente elevando las concentraciones de cAMP.

La causa principal de FSAD es una reducción en el flujo sanguíneo geintal y esta se manifiesta como una reducción

PATRICIA KOCH MORENO

en la congestión vaginal, labial y clitórica. El tratamiento de mujeres con FSAD es factible restableciendo la respuesta de excitación sexual normal. Esto puede conseguirse estimulando el flujo sanguíneo genital. Nuestro enfoque para el tratamiento de FSAD será estimular el flujo sanguíneo vaginal/lubricación por potenciación directa o indirecta de la señalización de cAMP endógeno, por ejemplo con un inhibidor de NEP (EC 3.4.24.11), o un inhibidor de PDE hidrolizante de cAMP o un antagonista de receptor de NPY. Esto tendrá el efecto genérico de restablecer o imitar la respuesta de excitación normal sin efectos secundarios cardiovasculares. Se estimulará la excitación sexual/congestión, más que inducirla simplemente en ausencia de estímulo sexual, que puede ser el caso con algunos agentes vasoactivos administrados exógenamente, por ejemplo VIP.

Todas las publicaciones mencionadas en la presente especificación se incorporan a la presente como referencia. Diversas modificaciones y variaciones de los procedimientos y el sistema descritos en la presente invención resultarán aparentes para los expertos en la técnica sin salirse del alcance y espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención se describe en conexión con realizaciones preferidas específicas, debe comprenderse que

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y

la invención como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. Es más, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en bioquímica y biotecnología o campos relacionados, se pretenden dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Por ejemplo, la presente invención comprende también la administración del agente de la presente invención antes y/o durante la estimulación sexual. Esto es ventajoso porque proporciona selectividad sistémica. La cascada natural aparece sólo en los genitales y no en otras localizaciones, por ejemplo en el corazón, etc. Por ello sería posible conseguir un efecto selectivo sobre los genitales.

## REFERENCIAS DEL TEXTO GENERAL

Ashur-Fabian, O., Perl. O., Lilling. G., et al., (1999) SNV, a lipophillic superactive VIP analogue, acts through cGMP to promote neuronal survival. *Peptides*, **20**, 629-633.

Berman, J.R., Berman, L., & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: Incidence, pathophysiology, evaluation and treatment options. *Urology*, **54**, 385-391.

PATRICIA VIGIL MORENO

Berman, J., Goldstein, I., Werbin, T. et al., (1999a). Double blind placebo controlled study with crossover to assess effect of sildenafil on physiological parameters of the females sexual response. *J. Urol.*, **161**, 805.

*Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV*, American Psychiatric Association, Washington DC. 1987, pág. 493-518.

Fan, Y.P., Chakder, S. & Ratton, S. (1999). Inhibitory effect of zinc protoporhyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal polypeptide and other receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 468-474.

Foda, H.D., Sharaf, H.H., Absood, A. et al. (1995). Pituitary adenilate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonges airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides*, **16**, 1057-1061.

Frank, E., Anderson, C. & Rubinstein, D. (1978). Frequency of sexual dysfunction in "normal" couples. *N. Engl. J. Med.*, **229**, 111-115.

Goldstein, I. & Berman, J.R: (1998). Vasculogenic female

PATRICIA KOEK MORENO

sexual dysfunction: vaginal engorgement and clitoral erectile insufficiency syndromes. *Int. J. Impot. Res.*, 10, pág. 84-90.

Gu, Z.F., Jensen, R.T. & Matton, P.N. (1992). A primary role for protein kinase A in smooth muscle relaxation induced by adrenergic agonists and neuropeptides. *Am. J. Physiol.*, 263, G360-G364.

Hoyle, C.H.V., Stones, R.W., Robson, T. et al. (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide containing nerves. *J. Anat.*, 188, 633-644.

Ingenhoven, N. & Beck-Sickingler, A.G. (1997). Fluorescent labelled analogues of neuropeptide Y for the characterisation of cells expressing NPY receptor subtypes. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, 17, 407-418.

Jovanovic, A., Jovanovic, S., Tulic, I. et al (1998). Predominant roles for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Human. Reprod.*, 4, 71-76.

Kaplan, H.S. (1974). The New Sex Therapy. Londres.

PATRICIA KOCK MORENO
INGLES Y ALEMAN
MADRID

Bailliere Tindall.

Kaplan, S.A., Reis, R.B., Kohm, I.J. et al. (1999). Safety and efficacy of sildenafil in postmenopausal women with sexual dysfunction. *Urology*, 53, 481-486.

Kim, Y.C., Choi, H.K., Ahn, Y.S., et al. (1994). The effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on rabbit cavernosal smooth muscle contractility. *J. Androl.*, 15, 392-739.

Laan, E. & Everaerd, W. (1988). Physiological measures of vaginal vasocongestion. *Int. J. Impot. Res.*, 10, pág. 107-110.

Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, 10, pág. 104-106.

Levin, R.J. (1980). The physiology of sexual function in women. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 7, 213-252.

Levin, R.J. (1991). VIP, vagina, clitoral and preurethral glans: An update on female genital arousal. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 98, 61-69.

PATRICIA KOCH MORENO

Levin, R.J. (1992). The mechanisms of human females sexual arousal. *Ann. Rev. Sex. Res.*, 3, 1-48.

Levin, R.J. & Wagner, G. (1986). TRH and vaginal blood flow-effects in conscious women and anaesthetised sheep. *J. Physiol.*, 373, 83p.

Lunberg, J.M., Modin, A. & Malmstrom, R.E. (1996), Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17, 301-304.

Masters, W.H., Johnson, V.E. *Human Sexual Response*, Little, Brown: Boston, 1996.

Ottesen, B., Gerstenberg, T., Ulrichsen, H. et al. (1983). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases vaginal blood flow and inhibits smooth muscle activity in women. *Eur. J. Clin. Invest.*, 13, 321-324.

Ottesen, B., Wagner, G. & Fahrenkrug, J. *Peptide innervation of the sexual organs*. En: Handbook of Sexology, vol. 6, The Pharmacological and Endocrinology of Sexual Function, Sitsen, J.M.A. (ed). Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1988), capítulo 4, pág. 66-97.

PATRICIA WICK MORENO
MADRID

Ottensen, B., Pedersen, B., Nielsen, J. et al. (1987). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides*, 8, 797-800.

Park, K., Goldstein, I., Andry, C., et al (1997). Vasculogenic female sexual dysfunction: results of a survey of 329 women in an outpatient gynecological clinic. *J. Sex. Marital Ther.*, 19, 171-188.

Schievi, R.C. & Seagraves, R.T. (1995). The biology of sexual function. *Psychiat. Cli. North. Am.*, 18, 7-23.

Schoeffter, P. & Stoclet, J.C. (1985). Effect of vasoactive intestinal polupeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 109, 275-279.

Serradell-Le Gal, C., Valette, G. Rouby, P.E. et al. (1995). SR 120819A, an orally active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Letters*, 3, 192-196.

Sjoberg, I. (1992). The vagina: Morphological, functional and ecological aspects. *Acta Obst. Gynecol. Scand.*, 71, 84-85.

PATRICIA KOCH MORENO

Spector, I.P. & Carey, M.P. (1990). Incidence and prevalence of sexual dysfunctions: a critical review of empirical literature. *Arch. Sex. Behav.*, **19**, 389-408.

Wagner, G. (1992). Aspects of genital physiology and pathology. *Sem. Neurol.*, **12**, 87-97.

Werbin, T., Salimpour, P., Berman, L, et al (1999). Effect of sexual stimulation and age on genital blood flow in women with sexual stimulation. *J. Urol.*, **161**, 688.

Wincze, J.P., Albert, A. & Bansal, S. (1993). Sexual arousal in diabetic females: Physiological and self-report measures. *Arch. Sex Behav.*, **22**, 587-601.

Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M. et al (1995). Subtype selectivity and antagonist profile of nonpeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 143-9.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION PDE

1. Han, P., Fletcher, C.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Yaremko, L.M., Michaeli, T. Assignemt of the mouse Pde7A

PATRICIA KREN MORENO
INGL
MADRID

to the proximal region of chromosome 3 and of the human PDE7A gene to chromosome 8q13. Genomics 48: 275-276, 1998.

2. Michaeli, T., Bloom, T.J., Martins. T., Loughney, K., Ferguson, K., Riggs, M., Rodgers, L. Beavo, J.A., Wigler, M.: Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phophodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem., 268: 12925-12932, 1993.

3. Milatocivh, A., Bolger, G., Michaeli, T., Francke, U.: Chromosome localization of genes for five cAMP-specific phosphidiesterases in man and mouse. Somat. Cell. Molec. Genet. 20:75-86, 1994.

4. Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K., Loghney, K.: Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3-prime, 5-prime-cyclic nucleotide phophodiesterase. Gene 191: 89-95, 1997.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NEP

1. Barker, P.E., Shipp, M.A., D'Adamio, L., Masteller, E.L., Reinherz, E.L. The common acute lymphoblastic

PATRICIA ... INGLÉS Y ALEMAN ... MADRID

leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3(q21-q27). J. Immun. 142:283-287, 1989.

2. D'Adamio, L., Shipp, M.A., Masteller, E.L., Reinherz, E.L.: Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5-prime untranslated regions. Proc. Nat. Acad. Sci. 86:7103-7107, 1989.

3. Letarte, M., Vera, S., Tran, R., Addis, J.B.L., Onizuka, R.J., Quackenbush, E.J., Jongneel, C.V., McInnes, R.R:: Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. J. Exp. Med. 168:1247-1253, 1988.

4. Shipp, M.A., Vijayaraghavan, J., Schmidt, E.V., Masteller, E.L., D'Adamio, L., Hersh, L.B., Reinherz, E.L.: Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. 86:297-301, 1989.

5. Tran-Paterson, R., Willard, H.F., Letarte, M.: The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 3.4.24.11) gene is located on human cromosome

PATRICIA [illegible]

3. Cancer Genet. 42:129-134, 1989.

REFERENCIAS PARA LA SECCION NPY

1. Allen, J.M., Bloom, S.R.: Neuropeptide Y, a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8:1-8, 1986.

2. Bahary, N., Zorich, G., Pachter, J.E., Leibel, R.L., Friedman, J.M.: Molecular genetic linkage maps of mouse chromosomes 4 and 6. Genomics 11:33-47, 1991.

3. Baker, E., Hort, Y.J., Ball, H., Sutherland, G.R., Shine, J., Herzog, H.: Assignment of the human neuropeptide Y gene to chromosome 7p15.1 by nonisotopic in situ hybridization. Genomics 26:163-164, 1995.

5. Carr, L.G., Foroud, T., Bice, P., Gobbert, T., Ivashina, J., Edenberg, H., Lumeng. L., Li, T.K.: A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. Alcohol Clin. Exp. Res. 22:884-887, 1998.

5. Dockray, G.J.: Neuropeptide Y: in search of a function. Neurochem. Int. 8:9-11, 1986.

6. Erickson, J.C., Clegg., K.E., Palmites, R.D.:

[illegible] MORENO
INO[illegible] Y [illegible]AN
[illegible] 113
C. [illegible] MADRID
Telf. [illegible]

Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. Nature 381: 415-421, 1996. PubMed ID: 86232796.

7. Erickson, J.C., Hollopeter, G., Palmiter, R.D.: Attenuation of the obesity syndrome og ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274: 1704-1706. 1996.

8. Karvonen, M.K., Pesonen, U., Koulu, M., Niskanen, L., Laakso, M., Rissanen, A., Dekker, J.M., t'Hart, L.M., Valve, R., Uusitupa, M.I.: Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. Nature Med. 4:1434-1437, 1998.

9. Maccarrone, C., Jarrott., B.; Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8:13-22, 1986.

10. Meisler, M.H., Spence, J.E., Dixon, J.E., Caldwell, R.M., Minth, C.D., Beaudet, A.L.: Exclusion of close linkage between the loci for cystic fibrosis and neuropeptide Y on human cromosome 7. Cytogenetic. Cell Genet. 44:175-176, 1987.

11. Minth, C.D., Andrews, P.C., Dixon, J.E.:

FATIMA [illegible] MORENO
[illegible] JUAN
13
MADRID

Characterization, sequence and expression of the clones human neuropeptide Y gene. J. Biol. Chem. 261:11974-11979, 1986.

12. Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M., Dixon, J.E.: Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptidase tyrosine. Proc. Nat. Acad. Sci. 81:4577-4581, 1984.

13. Takeuchi, T., Gumucio, D., Eddy, R., Meisler, M., Minth, C. Dixon, J., Yamada, T., Shows, T.: Assignments of the related pancreatic polypeptide (PPY) and neuropeptide Y (NPY) genes to regions on human chromosomes 17 and 7. (Resumen) Cytogenetic. Cell. Genet. 40:759 sólo, 1985.

14. Takeuchi, T., Gumucio, D.L., Yamada, T., Meisler, M.H., Minth, C.D., Dixon, J.E., Eddy, R.E., Shows, T.B.: Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. J. Clin. Invest. 77:1038-1041, 1986.

15. Terenghi, G., Polak, J.M., Hamid, Q., O'Brien, E., Denny, P., Legon, S., Dixon, J., Minth, C.D., Palay, S.L., Yasargil, G., Chan-Palay, V.: Localization of neuropeptide Y mRNA in neurons of human cerebral cortex by means of in

PATRICIA [illegible] MORENO [illegible] MADRID

544

situ hybridization with a complementary RNA probe. Proc. Nat. Acad. Sci. 84:7315-7318, 1987.

16. Thiele, T.E., Marsh, D.J., Ste. Marie, L., Bernstein, O.L., Palmiter, R.D.: Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. Nature 396:366-369, 1998.

17. Uusitupa, M.I.J., Karvonen, M.K., Pesonen, U., Koulu, M.: Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism. Ann. Med. 30:508-510, 1998.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPYR1

1. Herzog, H., Baumgartner, M., Vivero, C., Selbie, L.A., Auer, B., Shine, J.: Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor. J. Biol. Chem. 268:6703-6707, 1993.

2. Herzog, H., Darby, K., Ball, H., Hort., Beck-Sickinger, A., Shine, J.: Overlapping gene stucture of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests coordinate transcriptional regulation, Genomics 41:315-319,

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] RID

1997.

3. Herzog, H., Hort, Y.J., Ball, H.J., Hayes, G., Shine, J., Selbie, L.A.: Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two differente second messenger systems. Proc. Nat. Acad. Sci. 89:5974-5798, 1992.

4. Larhammer, D., Blomqvist, A.G., Yee, F., Jazin, E., Yoo, H., Whalestedt, C.: Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. J. Biol. Chem. 267:10935-10938, 1992.

5. Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson, D.A.: Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41:498-500, 1997.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPYR2

1. Ammar, D.A., Eadie, D.M., Wong, D.J., Ma, Y.-Y., Kolakowski, L.F. Jr., Yang-Feng, T.L., Thompson, D.A.: Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide receptor gene. Genomics 38:31-398, 1996.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible]
Telf. [illegible] - MADRID

2. Gerald, C., Walker, M.W:, Vaysse, P., J.-J., He, C., Brancheck, T.A., Weinsahnk, R.L.: Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. J. Biol. Chem. 270: 26758-26761, 1995.

3. Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson, D.A.: Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

4. Rose, P.M., Fernandes, P., Lynch, J.S., Frazier, S.T., Fisher, S.M., Kodukula, K., Kienzle, B., Seethala, R.: Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. J. Biol. Chem. 270:22661-22664, 1995.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VIP

1. Bodner, M., Fridkin, M. Gozes, I.: Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3548-3551, 1985.

2. Gotoh, E., Yamagami, T., Yamamoto, H., Okamoto, H.:

Chromosomal assignment of human VIP/PHM-27 gene to 6q26-q27 region by spot blot hybridization and in situ hybridization. Biochem. Int. 17:555-562, 1988.

3. Gozes, I., Avidor, R., Yahav, Y., Katznelson, D. Croce, C.M., Huebner, K.: The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21-6qter. Hum. Genet. 75:41-44, 1987.

4. Gozes, I., Nakai, H., Byers, M., Avidor, R., Weinstein, Y., Shani, Y., Shows, T.B.: Sequential expression in the nervous system of C-MYB and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24. Somat. Cell. Molec. Genet. 13:305-313, 1987.

5. Heinz-Erian, P., Dey. R.D., Flux, M. Said, S.I.: Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. Science 229: 1407-1408, 1985.

6. Itoh, N., Obata, K., Yanaihara, N., Okamoto, H.: Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature 304:547-549, 1983.

7. Linder, S., Barkhem, T., Norberg, A., Persson, H.,

[illegible] A.RID
Tele [illegible]

Schalling, M., Hokfelt, T., Magnusson, G.: Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. Proc. Nat. Acad. Sci. 84:605-60, 1987.

8. Omary, M.B., Kagnoff, M.F.: Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line, Science 238: 1578-1581, 1987.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION AC

1. Parma, J., Stengel, D., Gannage, M.-H., Poyard, M., Barouki, R., Hanoune, J.: Sequence of a human brain adenylyl cyclase partial cDNA: evidence for a consensus cyclase domain. Biochem. Biophys. Rs. Commun. 179:455-462, 1991.

2. Stengerl, D., Parma, J., Gannage, M.-H., Roeckel, N., Mattei, M.-G., Barouki, R., Hanoune, J.: Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. Hum. Genet. 90:126-130, 1992.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VPAC1

1. Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Darmoul, D., Maoret, J.-J., Carrero, I., Ogier-Denis, E., Laburthe, M.: Human

[illegible] MORENO
[illegible]AN
[illegible] 113
[illegible]RID
Telf. [illegible]

intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNS encoding proteins with different N-terminal domains. Biochem. Biopys. Res. Commun. 200:769-776, 1994.

2. Hashimoto, H., Nishino, A., Shintani, N., Hagihara, N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Yamamoto, K., Matsuda, T., Ishihara, T., Nagata, S., Baba, A.: Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VPAC-1) receptor. Genomics 58:90-93, 1999.

3. Libert, F., Passage, E., Parmentier, M., Simons, M.-J., Vassart, G., Mattei, M.-G., Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonine receptor. Genomics 11: 225-227, 1991.

4. Sreedharan, S.P., Huang, J.-X., Cheung, M.-C., Goetzl, E.J.: Structure, expression and chromosomal localization of the type I of human vasoactive intestinal peptide receptor gene. Proc. Nat. Acad. Sci. 92:2939-2943, 1995.

5. Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Huang, J.-X., Goetzl, E.J.: Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193:546-553, 1993.

[illegible] MORENO
INGL[illegible]
[illegible] 113
[illegible] ADRID

6. Sreedharan, S.P., Robichon, A., Peterson, K.E., Goetzl, E.J.: Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. 88:4986-4990, 1991.

7. Vassart, G.: Personal Communication. Bruselas, Bélgica, 1-15-1992.

8. Wenger, G.D.: Personal Communication, Columbus, Ohio, 8-3-1993.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VPAC2

1. Adamou, J.E., Aiyar, N., Van Horn, S., Elshourbagy, N.A.: Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 209:385-392, 1995.

2. MacKay, M., Fantes, J., Scherer, S., Boyle, S., West, K., Tsui, L.-C., Belloni, E., Lutz, E., Van Heyningen, V., Harmar, A.J.: Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. Genomics 37:345-353, 1996.

[illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Telef. [illegible]

3. Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., Goosens, J.-F., De Neef, P., Waelbroeck, M. Robberecht, P.: Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochem. Biophy. Res. Commun. 205:1617-1624, 1994.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL[illegible]
Telf. [illegible] ADRID

## LISTADO DE SECUENCIAS

### 1. NEP (EC 3.4.24.11)

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSMRNAEN 3181 pb mRNA PRI 12-sep-1993 |
| DEFINICION | mRNA humano de encefalinasa (EC 3.4.24.11) |
| ACCESO | X07166 |
| NID | g34757 |
| VERSION | X07166.1 GI: 34757 |
| PALABRAS CLAVE | encefalinasa, metaloproteína, endopeptidasa neutra |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 3181) |
| AUTORES | Malfroy, B., Kuang, W.J., Seeburg, P.H., Mason, A.J. y Schofield, P.R. |
| TITULO | Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). |
| REVISTA | FEBS. Lett. 229 (1), 206-210 (1998) |
| MEDLINE | 88152222 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |

PATRICIA PAGE MORENO

```
fuente          1...3181
                /organism="Homo sapiens"
                /db_xref="taxon:9606"
                /tissue_type="placenta"
                /clone_lib="lambda gt10"
                /clone="lambda H7"
   CDS          18..2249
                /note="enkephalinase (AA 1-743)"
                /codon_start=1
                /protein_id="CAA30157.1"
                /db_xref="PID:g34758"
                /db_xref="GI:34758"
                /db_xref="SWISS-PROT:P08473"
                /translation="MDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYAT
                YDDGICKSSDCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKYACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDI
                LRDELEVVLKDVLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINESAIDSRGGEPLLKLLPDIYGW
                PVATENWEQKYGASWTAEKAIAQLNSKYGKKVLINLFVGTDDKNSVNHVIHIDQPRLG
                LPSRDYYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDENQLALEMNKVMELEKEI
                ANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSLEINGKPFSWLNFTNEIMSTVNISITNE
                EDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTYKESRNAFRKALY
                GTTSETATWRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDD
                LTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNKLNNEYLELNYKEDEYFENIIQNL
                KFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSL
                NYGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSASNFKEQSQCMVYQYGNFSW
                DLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLGQAYRAYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQLFFLN
                FAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEKKC
                RVW"


misc_feature    3073..3078
                /note="poly A signal"
RECUENTO DE BASES  1055 a, 582 c, 657 g, 887 t
ORIGEN

      1 gcaagtcaga aagtcagatg gatataactg atatcaacac tccaaagcca aagaagaaac
     61 agcgatggac tccactggag atcagcctct cggtccttgt cctgctcctc accatcatag
    121 ctgtgacaat gatcgcactc tatgcaacct acgatgatgg tatttgcaag tcatcagact
    181 gcataaaatc agctgctcga ctgatccaaa acatggatgc caccactgag ccttgtacag
```

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
[illegible] RID

554

```
 241 actttttcaa atatgcttgc ggaggctggt tgaaacgtaa tgtcattccc gagaccagct
 301 cccgttacgg caactttgac attttaagag atgaactaga agtcgttttg aaagatgtcc
 361 ttcaagaacc caaaactgaa gatatagtag cagtgcagaa agcaaaagca ttgtacaggt
 421 cttgtataaa tgaatctgct attgatagca gaggtggaga acctctactc aaactgttac
 481 cagacatata tgggtggcca gtagcaacag aaaactggga gcaaaaatat ggtgcttctt
 541 ggacagctga aaaagctatt gcacaactga attctaaata tgggaaaaaa gtccttatta
 601 atttgtttgt tggcactgat gataagaatt ctgtgaatca tgtaattcat attgaccaac
 661 ctcgacttgg cctcccttct agagattact atgaatgcac tggaatctat aaagaggctt
 721 gtacagcata tgtggatttt atgatttctg tggccagatt gattcgtcag gaagaaagat
 781 tgcccatcga tgaaaaccag cttgctttgg aaatgaataa agttatggaa ttggaaaaag
 841 aaattgccaa tgctacggct aaacctgaag atcgaaatga tccaatgctt ctgtataaca
 901 agatgacatt ggcccagatc caaaataact tttcactaga gatcaatggg aagccattca
 961 gctggttgaa tttcacaaat gaaatcatgt caactgtgaa tattagtatt acaaatgagg
1021 aagatgtggt tgtttatgct ccagaatatt taaccaaact taagcccatt cttaccaaat
1081 attctgccag agatcttcaa aatttaatgt cctggagatt cataatggat cttgtaagca
1141 gcctcagccg aacctacaag gagtccagaa atgctttccg caaggccctt tatggtacaa
1201 cctcagaaac agcaacttgg agacgttgtg caaactatgt caatgggaat atggaaaatg
1261 ctgtggggag gctttatgtg gaagcagcat ttgctggaga gagtaaacat gtggtcgagg
1321 atttgattgc acagatccga gaagttttta ttcagacttt agatgacctc acttggatgg
1381 atgccgagac aaaaaagaga gctgaagaaa aggccttagc aattaaagaa aggatcggct
1441 atcctgatga cattgtttca aatgataaca aactgaataa tgagtacctc gagttgaact
1501 acaaagaaga tgaatacttc gagaacataa ttcaaaattt gaaattcagc caaagtaaac
1561 aactgaagaa gctccgagaa aaggtggaca aagatgagtg gataagtgga gcagctgtag
1621 tcaatgcatt ttactcttca ggaagaaatc agatagtctt cccagccggc attctgcagc
1681 ccccttctt tagtgcccag cagtccaact cattgaacta tgggggcatc ggcatggtca
1741 taggacacga aatcacccat ggcttcgatg acaatggcag aaactttaac aaagatggag
1801 acctcgttga ctggtggact caacagtctg caagtaactt taaggagcaa tcccagtgca
1861 tggtgtatca gtatggaaac ttttcctggg acctggcagg tggacagcac cttaatggaa
1921 ttaatacact gggagaaaac attgctgata atggaggtct tggtcaagca tacagagcct
1981 atcagaatta tattaaaaag aatggcgaag aaaaattact tcctggactt gacctaaatc
2041 acaaacaact atttttcttg aactttgcac aggtgtggtg tggaacctat aggccagagt
2101 atgcggttaa ctccattaaa acagatgtgc acagtccagg caatttcagg attattggga
2161 ctttgcagaa ctctgcagag ttttcagaag cctttcactg ccgcaagaat tcatacatga
2221 atccagaaaa gaagtgccgg gtttggtgat cttcaaaaga agcattgcag cccttggcta
2281 gacttgccaa caccacagaa atggggaatt ctctaatcga aagaaaatgg gccctagggg
2341 tcactgtact gacttgaggg tgattaacag agagggcacc atcacaatac agataacatt
2401 aggttgtcct agaaagggtg tggagggagg aagggggtct aaggtctatc aagtcaatca
2461 tttctcactg tgtacataat gcttaatttc taaagataat attactgttt atttctgttt
2521 ctcatatggt ctaccagttt gctgatgtcc ctagaaaaca atgcaaaacc tttgaggtag
2581 accaggattt ctaatcgaaa gggaaaagaa gatgttgaag aatacagtta ggcaccagaa
2641 gaacagtagg tgacactata gtttaaaaca cattgcctaa ctactagttt ttacttttat
2701 ttgcaacatt tacagtcctt caaaatcctt ccaaagaatt cttatacaca ttggggcctt
2761 ggagcttaca tagttttaaa ctcattttg ccatacatca gttattcatt ctgtgatcat
2821 ttattttaag cactcttaaa gcaaaaaatg aatgtctaaa attgtttttt gttgtacctg
2881 ctttgactga tgctgagatt cttcaggctt cctgcaattt tctaagcaat ttcttgctct
2941 atctctcaaa acttggtatt tttcagagat ttatataaat gtaaaaataa taattttat
3001 atttaattat taactacatt tatgagtaac tattattata ggtaatcaat gaatattgaa
3061 gtttcagctt aaaataaaca gttgtgaacc aagatctata aagcgatata cagatgaaaa
3121 tttgagacta tttaacttta taaatcatat tgatgaaaag atttaagcac aaactttagg
3181 g
```

PATRICIA MORO MORENO
INGLES Y ALEMAN
MADRID

2. **PDE de tipo 1**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSPDE1A3A 2008 pb mRNA PRI 12-abr-1996 |
| DEFINICION | mRNA de fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos 3',5' humana (HSPDE1A3A), cd completo. |
| ACCESO | U40370 |
| NID | g1151108 |
| VERSION | U40370.1 GI: 1151108 |
| PALABRAS CLAVE | fosfodiesterasa estimulada por calmodulina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 2008) |
| AUTORES | Loughney, K., Martins., T.J., Harris, E.A., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., y Ferguson, K. |
| TITULO | Isolation and characterization of cDNA corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterases |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 271 (2), 796-806 (1996) |
| MEDLINE | 96132810 |

PATRICIA ... MORENO
ING... MAN
... RID
Tel...

REFERENCIA 2 (bases 1 a 2008)

AUTORES Loughney, K., Martins., T.J., Harris, E.A., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., y Ferguson, K.

TITULO Envío directo

REVISTA Enviado el 7 de noviembre de 1995. Kate Loughney, ICOS, 2201 20th Ave. S.E., Bothell, WA 98021, EE.UU.

```
CARACTERISTICAS          Localización/Cualificadores
fuente                   1...2008
                       /organism="Homo sapiens"
                       /db_xref="taxon:9606"
     gene              85..1692
                       /gene="PDE1A"
     CDS               85..1692
                       /gene="PDE1A"
                       /note="PDE1A3; type I phosphodiesterase"
                       /codon_start=1
                       /product="3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase"
                       /protein_id="AAC50436.1"
                       /db_xref="PID:g1151109"
                       /db_xref="GI:1151109"
                       /translation="MGSSATEIEELENTTFKYLTGEQTEKMWQRLKGILRCLVKQLER
                       GDVNVVDLKKNIEYAASVLEAVYIDETRRLLDTEDELSDIQTDSVPSEVRDWLASTFT
                       RKMGMTKKKPEEKPKFRSIVHAVQAGIFVERMYRKTYHMVGLAYPAAVIVTLKDVDKW
                       SFDVFALNEASGEHSLKFMIYELFTRYDLINRFKIPVSCLITFAEALEVGYSKYKNPY
                       HNLIHAADVTQTVHYIMLHTGIMHWLTELEILAMVFAAAIHDYEHTGTTNNFHIQTRS
                       DVAILYNDRSVLENHHVSAAYRLMQEEEMNILINLSKDDWRDLRNLVIEMVLSTDMSG
                       HFQQIKNIRNSLQQPEGIDRAKTMSLILHAADISHPAKSWKLHYRWTMALMEEFFLQG
                       DKEAELGLPFSPLCDRKSTMVAQSQIGFIDFIVEPTFSLLTDSTEKIVIPLIEEASKA
                       ETSSYVASSSTTIVGLHIADALRRSNTKGSMSDGSYSPDYSLAAVDLKSFKNNLVDII
                       QQNKERWKELAAQEARTSSQKCEFIHQ"
```

RECUENTO DE BASES 627 a, 400 c, 437 g, 544 t

PATENTES [illegible] MORENO
ING. [illegible] ALEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

557

ORIGEN

```
   1 gaattctgat gtgcttcagt gcacagaaca gtaacagatg agctgctttt ggggagagct
  61 tgagtactca gtcggagcat catcatgggg tctagtgcca cagagattga agaattggaa
 121 aacaccactt ttaagtatct tacaggagaa cagactgaaa aaatgtggca gcgcctgaaa
 181 ggaatactaa gatgcttggt gaagcagctg gaaagaggtg atgttaacgt cgtcgactta
 241 aagaagaata ttgaatatgc ggcatctgtg ctggaagcag tttatatcga tgaaacaaga
 301 agacttctgg atactgaaga tgagctcagt gacattcaga ctgactcagt cccatctgaa
 361 gtccgggact ggttggcttc taccttttaca cggaaaatgg ggatgacaaa aaagaaacct
 421 gaggaaaaac caaaatttcg gagcattgtg catgctgttc aagctggaat tttgtggaa
 481 agaatgtacc gaaaaacata tcatatggtt ggtttggcat atccagcagc tgtcatcgta
 541 acattaaagg atgttgataa atggtctttc gatgtatttg ccctaaatga agcaagtgga
 601 gagcatagtc tgaagtttat gatttatgaa ctgtttacca gatatgatct tatcaaccgt

 661 ttcaagattc ctgtttcttg cctaatcacc tttgcagaag ctttagaagt tggttacagc
 721 aagtacaaaa atccatatca caatttgatt catgcagctg atgtcactca aactgtgcat
 781 tacataatgc ttcatacagg tatcatgcac tggctcactg aactggaaat tttagcaatg
 841 gtctttgctg ctgccattca tgattatgag catacaggga caacaaacaa ctttcacatt
 901 cagacaaggt cagatgttgc cattttgtat aatgatcgct ctgtccttga gaatcaccac
 961 gtgagtgcag cttatcgact tatgcaagaa gaagaaatga atatcttgat aaatttatcc
1021 aaagatgact ggagggatct tcggaaccta gtgattgaaa tggttttatc tacagacatg
1081 tcaggtcact tccagcaaat taaaaatata agaaacagtt tgcagcagcc tgaagggatt
1141 gacagagcca aaaccatgtc cctgattctc cacgcagcag acatcagcca cccagccaaa
1201 tcctggaagc tgcattatcg gtggaccatg gccctaatgg aggagttttt cctgcaggga
1261 gataaagaag ctgaattagg gcttccattt tccccacttt gtgatcggaa gtcaaccatg
1321 gtggcccagt cacaaatagg tttcatcgat ttcatagtag agccaacatt tttcttctg
1381 acagactcaa cagagaaaat tgttattcct cttatagagg aagcctcaaa agccgaaact
1441 tcttcctatg tggcaagcag ctcaaccacc attgtggggt tacacattgc tgatgcacta
1501 agacgatcaa atacaaaagg ctccatgagt gatgggtcct attccccaga ctactccctt
1561 gcagcagtgg acctgaagag tttcaagaac aacctggtgg acatcattca gcagaacaaa
1621 gagaggtgga aagagttagc tgcacaagaa gcaagaacca gttcacagaa gtgtgagttt
1681 attcatcagt aaacaccttt aagtaaaacc tcgtgcatgg tggcagctct aatttgacca
1741 aaagacttgg agattttgat tatgcttgct ggaaatctac cctgtcctgt gtgagacagg
1801 aaatctattt ttgcagattg ctcaataagc atcatgagcc acataaataa cagctgtaaa
1861 ctccttaatt caccgggctc aactgctacc gaacagattc atctagtggc tacatcagca
1921 ccttgtgctt tcagatatct gtttcaatgg cattttgtgg catttgtctt taccgagtgc
1981 caataaattc tctttgagca aaaaaaaa
```

## 2. PDE de tipo 2

LOCUS HSU67733 4240 pb mRNA PRI 21-may-1997

DEFINICION mRNA de fosfodiesterasa de nucleótidos

PATRICIA KOCH MORENO
INGLÉS Y ALEMAN
MADRID

| | |
|---|---|
| | cíclicos 3',5' humana estimulada por cGMP PDE2A3 (PDE2A), cd completo. |
| ACCESO | U67733 |
| NID | g2108051 |
| VERSION | U67733.1 GI: 2108051 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana. |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 4240) |
| AUTORES | Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K. and Loughley, K. |
| TITULO | Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterase |
| REVISTA | Gene 191 (1), 89-95 (1997) |
| MEDLINE | 97354299 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 4240) |
| AUTORES | Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K. and Loughley, K. |
| TITULO | Envío directo |

PATRICIA ... MORENO
INGL... Y ...
...RID

```
REVISTA          Enviado el 21 de agosto de 1996. ICOS
                 Corporation, 2201 20th Ave. S.E., Bothell,
                 WA 98021, EE.UU.
CARACTERISTICAS       Localización/Cualificadores
fuente           1...4240
                  /organism="Homo sapiens"
                  /db_xref="taxon:9606"
 gene             162..2987

                /gene="PDE2A"
 CDS            162..2987
                /gene="PDE2A"
                /function="cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide
                phosphodiesterase"
                /note="PDE2 family; splice variant 3"
                /codon_start=1
                /product="PDE2A3"
                /protein_id="AAC51320.1"
                /db_xref="PID:g2108052"
                /db_xref="GI:2108052"
                /translation="MGQACGHSILCRSQQYPAARPAEPRGQQVFLKPDEPPPPPQPCA
                DSLQDALLSLGSVIDISGLQRAVKEALSAVLPRVETVYTYLLDGESQLVCEDPPHELP
                QEGKVREAIISQKRLGCNGLGFSDLPGKPLARLVAPLAPDTQVLVMPLADKEAGAVAA
                VILVHCGQLSDNEEWSLQAVEKHTLVALRRVQVLQQRGPREAPRAVQNPPEGTAEDQK
                GGAAYTDRDRKILQLCGELYDLDASSLQLKVLQYLQQETRASRCCLLLVSEDNLQLSC
                KVIGDKVLGEEVSFPLTGCLGQVVEDKKSIQLKDLTSEDVQQLQSMLGCELQAMLCVP
                VISRATDQVVALACAFNKLEGDLFTDEDEHVIQHCFHYTSTVLTSTLAFQKEQKLKCE
                CQALLQVAKNLFTHLDDVSVLLQEIITEARNLSNAEICSVFLLDQNELVAKVFDGGVV
                DDESYEIRIPADQGIAGHVATTGQILNIPDAYAHPLFYRGVDDSTGFRTRNILCFPIK
                NENQEVIGVAELVNKINGPWFSKFDEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHL
                ANEMMMYHMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQ
                DMNFINNYKIDCPTLARFCLMVKKGYRDPPYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLE
                DIEIFALFISCMCHDLDHRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSVMERHHFAQAIAILNT
                HGCNIFDHFSRKDYQRMLDLMRDIILATDLAHHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHHRL
                LLCLLMTSCDLSDQTKGWKTTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIP
                ELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNREHWTKVSHKFTIRGLPSNNSLD
                FLDEEYEVPDLDGTRAPINGCCSLDAE"

RECUENTO DE BASES 902 a, 1260 c, 1202 g, 876 t
```

PATRICIA KUAN MORENO
ING.
MADRID

ORIGEN

```
   1 cagcagagct ggattggggt gttgagtcca ggctgagtag ggggcagccc actgctcttg
  61 gtccctgtgc ctgctggggg tgccctgccc tgaactccag gcagcgggga cagggcgagg
 121 tgccacctta gtctggctgg ggaggcggac gatgaggagt gatggggcag gcatgcggcc
 181 actccatcct ctgcaggagc cagcagtacc cggcagcgcg accggctgag ccgcggggcc
 241 agcaggtctt cctcaagccg gacgagccgc cgccgccgcc gcagccatgc gccgacagcc
 301 tgcaggacgc cttgctgagt ctgggctctg tcatcgacat ttcaggcctg caacgtgctg
 361 tcaaggaggc cctgtcagct gtgctccccc gagtggaaac tgtctacacc tacctactgg
 421 atggtgagtc ccagctggtg tgtgaggacc ccccacatga gctgccccag gaggggaaag
 481 tccgggaggc tatcatctcc cagaagcggc tgggctgcaa tgggctgggc ttctcagacc
 541 tgccagggaa gccccttggcc aggctggtgg ctccactggc tcctgatacc caagtgctgg
 601 tcatgccgct agcggacaag gaggctgggg ccgtggcagc tgtcatcttg gtgcactgtg
 661 gccagctgag tgataatgag gaatggagcc tgcaggcggt ggagaagcat accctggtcg
 721 ccctgcggag ggtgcaggtc ctgcagcagc gcgggcccag ggaggctccc cgagccgtcc
 781 agaacccccc ggaggggacg gcggaagacc agaagggcgg ggcggcgtac accgaccgcg
 841 accgcaagat cctccaactg tgcggggaac tctacgacct ggatgcctct tccctgcagc
 901 tcaaagtgct ccaatacctg cagcaggaga cccgggcatc ccgctgctgc ctcctgctgg
 961 tgtcggagga caatctccag ctttcttgca aggtcatcgg agacaaagtg ctcggggaag
1021 aggtcagctt tcccttgaca ggatgcctgg gccaggtggt ggaagacaag aagtccatcc
1081 agctgaagga cctcacctcc gaggatgtac aacagctgca gagcatgttg ggctgtgagc
1141 tgcaggccat gctctgtgtc cctgtcatca gccgggccac tgaccaggtg gtggccttgg
1201 cctgcgcctt caacaagcta gaaggagact tgttcaccga cgaggacgag catgtgatcc
1261 agcactgctt ccactacacc agcaccgtgc tcaccagcac cctggccttc cagaaggaac
1321 agaaactcaa gtgtgagtgc caggctcttc tccaagtggc aaagaacctc ttcacccacc
1381 tggatgacgt ctctgtcctg ctccaggaga tcatcacgga ggccagaaac ctcagcaacg
1441 cagagatctg ctctgtgttc ctgctggatc agaatgagct ggtggccaag gtgttcgacg
1501 gggggcgtggt ggatgatgag agctatgaga tccgcatccc ggccgatcag ggcatcgcgg
1561 gacacgtggc gaccacgggc cagatcctga acatccctga cgcatatgcc catccgcttt
1621 tctaccgcgg cgtggacgac agcaccggct tccgcacgcg caacatcctc tgcttcccca
```

```
1681 tcaagaacga gaaccaggag gtcatcggtg tggccgagct ggtgaacaag atcaatgggc
1741 catggttcag caagttcgac gaggacctgg cgacggcctt ctccatctac tgcggcatca
1801 gcatcgccca ttctctccta tacaaaaaag tgaatgaggc tcagtatcgc agccacctgg
1861 ccaatgagat gatgatgtac cacatgaagg tctccgacga tgagtatacc aaacttctcc
1921 atgatgggat ccagcctgtg gctgccattg actccaattt tgcaagtttc acctataccc
1981 ctcgttccct gcccgaggat gacacgtcca tggccatcct gagcatgctg caggacatga
2041 atttcatcaa caactacaaa attgactgcc cgaccctggc ccggttctgt ttgatggtga
2101 agaagggcta ccgggatccc ccctaccaca actggatgca cgccttttct gtctcccact
2161 tctgctacct gctctacaag aacctggagc tcaccaacta cctcgaggac atcgagatct
2221 ttgccttgtt tatttcctgc atgtgtcatg acctggacca cagaggcaca aacaactctt
2281 tccaggtggc ctcgaaatct gtgctggctg cgctctacag ctctgagggc tccgtcatgg
2341 agaggcacca ctttgctcag gccatcgcca tcctcaacac ccacggctgc aacatctttg
2401 atcatttctc ccggaaggac tatcagcgca tgctggatct gatgcgggac atcatcttgg
2461 ccacagacct ggcccaccat ctccgcatct tcaaggacct ccagaagatg gctgaggtgg
2521 gctacgaccg aaacaacaag cagcaccaca gacttctcct ctgcctcctc atgacctcct
2581 gtgacctctc tgaccagacc aagggctgga agactacgag aaagatcgcg gagctgatct
2641 acaaagaatt cttctcccag ggagacctgg agaaggccat gggcaacagg ccgatggaga
2701 tgatggaccg ggagaaggcc tatatccctg agctgcaaat cagcttcatg gagcacattg
2761 caatgcccat ctacaagctg ttgcaggacc tgttccccaa agcggcagag ctgtacgagc
2821 gcgtggcctc caaccgtgag cactggacca aggtgtccca caagttcacc atccgcggcc
2881 tcccaagtaa caactcgctg gacttcctgg atgaggagta cgaggtgcct gatctggatg
2941 gcactagggc cccatcaat ggctgctgca gccttgatgc tgagtgatcc cctccaggac
3001 acttccctgc ccaggccacc tcccacagcc ctccactggt ctggccagat gcactgggaa
3061 cagagccacg ggtcctgggt cctagaccag gacttcctgt gtgaccctgg acaagtacta
3121 ccttcctggg cctcagcttt ctcgtctgta taatggaagc aagacttcca acctcacgga
3181 gactttgtaa tttgcttctc tgagagcaca ggggtgacca atgagcagtg ggccctactc
3241 tgcacctctg accacacctt ggcaagtctt tcccaagcca ttctttgtct gagcagcttg
3301 atggtttctc cttgccccat ttctgcccca ccagatcttt gctcctttcc ctttgaggac
3361 tcccaccctt tgggtctcca ggatcctcat ggaaggggaa ggtgagacat ctgagtgagc
3421 agagtgtggc atcttggaaa cagtccttag ttctgtggga ggactagaaa cagccgcggc
3481 gaaggccccc tgaggaccac tactatactg atggtgggat tgggacctgg gggatacagg
3541 ggccccagga agaagctggc cagaggggca gctcagtgct ctgcagagag gggccctggg
3601 gagaagcagg atgggattga tgggcaggag ggatccccgc actgggagac aggcccaggt
3661 atgaatgagc cagccatgct tcctcctgcc tgtgtgacgc tgggcgagtc tcttcccctg
3721 tctgggccaa acagggagcg ggtaagacaa tcccatgctct aagatccatt ttagatcaat
3781 gtctaaaata gctctatggc tctgcggagt cccagcagag gctatggaat gtttctgcaa
3841 ccctaaggca cagagagcca accctgagtg tctcagaggc cccctgagtg ttccccttgg
3901 cctgagcccc ttacccattc ctgcagccag tgagagacct ggcctcagcc tggcagcgct
3961 ctcttcaagg ccatatccac ctgtgccctg ggcttggga gaccccatag gccgggactc
4021 ttgggtcagc ccgccactgg cttctctctt tttctccgtt tcattctgtg tgcgttgtgg
4081 ggtgggggag gggtccacc tgccttacct ttctgagttg cctttagaga gatgcgtttt
4141 tctaggactc tgtgcaactg tcgtatatgg tcccgtgggc tgaccgcttt gtacatgaga
4201 ataaatctat ttctttctac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES [illegible]
[illegible] MADRID

4. **NPY**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HUMNPY 551 pb mRNA PRI 7-ene-1995 |
| DEFINICION | mRNA de neuropéptido Y humano (NPY), cd completo. |
| ACCESO | K01911 |
| NID | g189273 |
| VERSION | K01911.1 GI:189273 |
| PALABRAS CLAVE | neuropéptido Y |
| FUENTE | feocromocitoma humano, cDNA a mRNA, clon pNPY3-75 |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 551) |
| AUTORES | Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M. y Dixon, J.E. |
| TITULO | Cloning, characterization and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine |
| REVISTA | Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (14), 4577-4581 (1984) |
| MEDLINE | 84272678 |
| COMENTARIO | El neuropéptido Y (NPY) es uno de los péptidos más abundantes en el sistema |

PATRICIA ... MORENO
ING. ... ALEMAN
C ... 113
Tel. ... MADRID

563

nervioso mamífero, y su extensa distribución sugiere un papel neurotransmisor o modulador. También se encuentra en algunas células de cromafina de la médula suprarrenal.

```
CARACTERISTICAS         Localización/Cualificadores
fuente                  1...551

                   /organism="Homo sapiens"
                   /db_xref="taxon:9606"
                   /tissue_type="pheochromocytoma"
                   /map="7pter-q22"
   mRNA            <1..551
                   /gene="NPY"
                   /note="G00-119-456"
   gene            1..551
                   /gene="NPY"
   sig_peptide     87..170
                   /gene="NPY"
                   /note="G00-119-456"
   CDS             87..380
                   /gene="NPY"
                   /codon_start=1
                   /db_xref="GDB:G00-119-456"
                   /product="neuropeptide Y"
                   /protein_id="AAA59944.1"
                   /db_xref="PID:g189274"
                   /db_xref="GI:189274"
                   /translation="MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAED
                   MARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRLEDPAMW"
   mat_peptide     171..278
                   /gene="NPY"
                   /note="G00-119-456"
                   /product="neuropeptide Y"
```

RECUENTO DE BASES 131 a, 171 c, 129 g, 120 t

MORENO

564

```
ORIGEN          51 pb cadena arriba de un sitio RsaI

      1 accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc
     61 ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgactgggg ctgtccggac
    121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgaggcg taccccctcca
    181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
    241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
    301 cactgatttc agacctcttg atgagagaaa gcacagaaaa tgttcccaga actcggcttg
    361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
    421 gcccatattt catcgtgtaa aacgagaatc cacccatcct accaatgcat gcagccactg
    481 tgctgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
    541 atcatgcatt c
```

## 5. Receptor de NPY Y1

```
LOCUS           A26481     2624 pb    mRNA PRI   17-oct-1995
DEFINICION      cDNA del gen del receptor Y1 de NPY humano.
ACCESO          A26481
NID             g1247452
VERSION         A26481.1 GI:1247452
PALABRAS CLAVE  -
FUENTE          humana
ORGANISMO       Homo sapiens
                Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata,
                Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini,
                Hominidae, Homo.
REFERENCIA      1 (bases 1 a 2624)
AUTORES         -
TITULO          HUMAN NEUROPEPTIDE Y-Y1 RECEPTOR
REVISTA         Patente: WO 9309227-A 3 13 de mayo de 1993)
CARACTERISTICAS           Localización/Cualificadores
```

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID

565

```
fuente          1..2624
                /organism="Homo sapiens"
                /db_xref="taxon:9606"
  CDS           152..1306
                /codon_start=1
                /product="neuropeptide Y Y1 receptor"
                /protein_id="CAA01819.1"
                /db_xref="PID:e205126"
                /db_xref="PID:g1247453"
                /db_xref="GI:1247453"
                /db_xref="SWISS-PROT:P25929"
                /translation="MNSTLFSQVENHSVHSNFSEKNAQLLAFENDDCHLPLAMIFTLA
                LAYGAVIILGVSGNLALIIIILKQKEMRNVTNILIVNLSFSDLLVAIMCLPFTFVYTL
                MDHWVFGEAMCKLNPFVQCVSITVSIFSLVLIAVERHQLIINPRGWRPNNRHAYVGIA
                VIWVLAVASSLPFLIYQVMTDEPFQNVTLDAYKDKYVCFDQFPSDSHRLSYTTLLLVL
                QYFGPLCFIFICYFKIYIRLKRRNNMMDKMRDNKYRSSETKRINIMLLSIVVAFAVCW
                LPLTIFNTVFDWNHQIIATCNHNLLFLLCHLTAMISTCVNPIFYGFLNKNFQRDLQFF
                FNFCDFRSRDDDYETIAMSTMHTDVSKTSLKQASPVAFKKINNNDDNEKI"

RECUENTO DE BASES 791 a, 479 c, 473 g, 878 t, 3 otras

ORIGEN

    1441 tttttactg cttttgttgt agtgtcataa ttacatttgg aacaaaggt gtgggctttg
    1501 gggtcttctg gaaatagttt tgaccagaca tctttgaagt gctttttgtg aatttatgca
    1561 tataatataa agacttttat actgtactta ttggaatgaa atttctttaa agtattacga
    1621 tnnnctgact tcagaagtac ctgccatcca atacggtcat tagattgggt catcttgatt
    1681 agattagatt agattagatt gtcaacagat tgggccatcc ttactttatg ataggcatca
    1741 ttttagtgtg ttacaatagt aacagtatgc aaaagcagca ttcaggagcc gaaagatagt
    1801 cttgaagtca ttcagaagtg gtttgaggtt tctgtttttt ggtggttttt gtttgttttt
    1861 ttttttttc accttaaggg aggctttcat ttcctcccga ctgattgtca cttaaatcaa
    1921 aatttaaaaa tgaataaaaa gacatacttc tcagctgcaa atattatgga gaattgggca
    1981 cccacaggaa tgaagagaga aagcagctcc ccaacttcaa aaccattttg gtacctgaca
    2041 acaagagcat tttagagtaa ttaatttaat aaagtaaatt agtattgctg caaatagcta
    2101 aattatattt atttgaattg atggtcaaga gattttccat tttttttaca gactgttcag
    2161 tgtttgtcaa gcttctggtc taatatgtac tcgaaagact ttccgcttac aatttgtaga
    2221 aacacaaata tcgttttcca tacagcagtg cctatatagt gactgatttt aactttcaat
    2281 gtccatcttt caaaggaagt aacaccaagg tacaatgtta aaggaatatt cactttacct
    2341 agcagggaaa aatacacaaa aactgcagat acttcatata gcccatttta acttgtataa
    2401 actgtgtgac ttgtggcgtc ttataaataa tgcactgtaa agattactga atagttgtgt
    2461 catgttaatg tgcctaattt catgtatctt gtaatcatga ttgagcctca gaatcatttg
    2521 gagaaactat attttaaaga acaagacata cttcaatgta ttatacagat aaagtattac
    2581 atgtgtttga ttttaaaagg gcggacattt tattaaaatc aagg
```

PATRICIA ... MORENO
MADRID

```
   1 attgttcagt tcaagggaat gaagaattca gaataatttt ggtaaatgga ttccaatatc
  61 gggaataaga ataagctgaa cagttgacct gctttgaaga aacatactgt ccatttgtct
 121 aaaataatct ataacaacca aaccaatcaa aatgaattca acattatttt cccaggttga
 181 aaatcattca gtccactcta atttctcaga gaagaatgcc cagcttctgg cttttgaaaa
 241 tgatgattgt catctgccct tggccatgat atttacctta gctcttgctt atggagctgt
 301 gatcattctt ggtgtctctg gaaacctggc cttgatcata atcatcttga aacaaaagga
 361 gatgagaaat gttaccaaca tcctgattgt gaacctttcc ttctcagact tgcttgttgc
 421 catcatgtgt ctcccccttta catttgtcta cacattaatg gaccactggg tctttggtga
 481 ggcgatgtgt aagttgaatc cttttgtgca atgtgtttca atcactgtgt ccatttctc
 541 tctggttctc attgctgtgg aacgacatca gctgataatc aaccctcgag ggtggagacc
 601 aaataataga catgcttatg taggtattgc tgtgatttgg gtccttgctg tggcttcttc
 661 tttgcctttc ctgatctacc aagtaatgac tgatgagccg ttccaaaatg taacacttga
 721 tgcgtacaaa gacaaatacg tgtgctttga tcaatttcca tcggactctc ataggttgtc
 781 ttataccact ctcctcttgg tgctgcagta ttttggtcca ctttgtttta tatttatttg
 841 ctacttcaag atatatatac gcctaaaaag gagaaacaac atgatggaca agatgagaga
 901 caataagtac aggtccagtg aaaccaaaag aatcaatatc atgctgctct ccattgtggt
 961 agcatttgca gtctgctggc tccctcttac catctttaac actgtgtttg attggaatca
1021 tcagatcatt gctacctgca accacaatct gttattcctg ctctgccacc tcacagcaat
1081 gatatccact tgtgtcaacc ccatatttta tgggttcctg aacaaaaact tccagagaga
1141 cttgcagttc ttcttcaact ttgtgatttt ccggtctcgg gatgatgatt atgaaacaat
1201 agccatgtcc acgatgcaca cagatgtttc caaaacttct ttgaagcaag caagcccagt
1261 cgcatttaaa aaaatcaaca acaatgatga taatgaaaaa atctgaaact acttatagcc
1321 tatggtcccg gatgacatct gtttaaaaac aagcacaacc tgcaacatac tttgattacc
1381 tgttctccca aggaatgggg ttgaaatcat ttgaaaatga ctaagatttt cttgtcttgc
```

## 6. Receptor de NPY·Y2

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSU36269 1200 pb mRNA PRI 14-nov-1995 |
| DEFINICION | mRNA del receptor Y2 de neuropéptido Y/péptido YY humano, cd completo. |
| ACCESO | U36269 |
| NID | g1063633 |
| VERSION | U36269.1 GI:1063633 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, |

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] 13
MADRID

| | |
|---|---|
| | Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1200) |
| AUTORES | Gerald, C., Walker, M.W., Vayssem P.J., He, C., Brancheck, T.A. y Weinshank, R.L. |
| TITULO | Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 270 (45), 26758-26761 (1995) |
| MEDLINE | 96070760 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 1200) |
| AUTORES | Gerald, C.A. |
| TITULO | Envio directo |
| REVISTA | Enviada el 13 de septiembre de 1995. Christophe A. Gerald, Synaptic Pharmaceutical Corporation, Molecular Biology, 215 College Road, Paramus, NJ 07562, EE.UU. |

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

fuente 1..1200

MORENO
MAN
DRID

```
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /clone="hhY2"
                     /sex="male"
                     /tissue_type="brain hippocampus"
                     /dev_stage="adult"
     5'UTR           1..20

     CDS             21..1166
                     /note="NPY/PYY Y2 receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor"
                     /protein_id="AAC50281.1"
                     /db_xref="PID:g1063634"
                     /db_xref="GI:1063634"
                     /translation="MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGPQTTPRGELVPDPEPELIDST
                     KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTL
                     CLPFTLTYTLMGEWKMGPVLCHLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKI
                     SKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEKSIYGTV
                     YSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAANDHYHQRRQKTTKMLVCVVVV
                     FAVSWLPLHAFQLAVDIDSQVLDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRK
                     AFLSAFRCEQRLDAIHSEVSVTFKAKKNLEVRKNSGPNDSFTEATNV"
     3'UTR           1164..1200

RECUENTO DE BASES 292 a, 295 c, 299 g, 314 t
```

ORIGEN

```
   1 caagtggacc tgtactgaaa atgggtccaa taggtgcaga ggctgatgag aaccagacag
  61 tggaagaaat gaaggtggaa caatacgggc cacaaacaac tcctagaggt gaactggtcc
 121 ctgaccctga gccagagctt atagatagta ccaagctgat tgaggtacaa gttgttctca
 181 tattggccta ctgctccatc atcttgcttg ggtaattgg caactccttg gtgatccatg
 241 tggtgatcaa attcaagagc atgcgcacag taaccaactt tttcattgcc aatctggctg
 301 tggcagatct tttggtgaac actctgtgtc taccgttcac tcttacctat accttaatgg
 361 gggagtggaa aatgggtcct gtcctgtgcc acctggtgcc ctatgcccag ggcctggcag
 421 tacaagtatc cacaatcacc ttgacagtaa ttgccctgga ccggcacagg tgcatcgtct
 481 accacctaga gagcaagatc tccaagcgaa tcagcttcct gattattggc ttggcctggg
 541 gcatcagtgc cctgctggca agtcccctgg ccatcttccg ggagtattcg ctgattgaga
 601 tcatcccgga ctttgagatt gtggcctgta ctgaaaagtg gcctggcgag gagaagagca
 661 tctatggcac tgtctatagt ctttcttcct tgttgatctt gtatgttttg cctctgggca
 721 ttatatcatt ttcctacact cgcatttgga gtaaattgaa gaaccatgtc agtcctggag
 781 ctgcaaatga ccactaccat cagcgaaggc aaaaaaccac caaaatgctg gtgtgtgtgg
 841 tggtggtgtt tgcggtcagc tggctgcctc tccatgcctt ccagcttgcc gttgacattg
 901 acagccaggt cctggacctg aaggagtaca aactcatctt cacagtgttc cacatcatcg
 961 ccatgtgctc cacttttgcc aatcccctte tctatggctg gatgaacagc aactacagaa
1021 aggctttcct ctcggccttc cgctgtgagc agcggttgga tgccattcac tctgaggtgt
1081 ccgtgacatt caaggctaaa aagaacctgg aggtcagaaa gaacagtggc cccaatgact
1141 ctttcacaga ggctaccaat gtctaaggaa gctgtggtgt gaaaatgtat ggatgaattc
```

## 7. Receptor de NPY Y2

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSU66275 1370 pb mRNA PRI 18-oct-1996 |
| DEFINICION | mRNA del receptor Y5 de neuropéptido humano (NPYR5), cd completo. |
| ACCESO | U66275 |
| NID | g1620655 |
| VERSION | U66275.1 GI:1620655 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens |
| | Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, |

[illegible] MORENO
[illegible] MADRID

| | |
|---|---|
| | Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1370) |
| AUTORES | Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., DeCarr, L.B:, Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang., P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velázquez, N. y McCaleb, M.L. |
| TITULO | Identification of a novle hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behaviour |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 271 (42), 26315-26319 (1996) |
| MEDLINE | 96421636 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 1370) |
| AUTORES | Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., DeCarr, L.B:, Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang., P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velázquez, N. y McCaleb, M.L. |
| TITULO | Envio directo |
| REVISTA | Enviada el 6 de agosto de 1996. Metabolic Disorders. Bayer Corporation, 400 Morgan Lane, West Haven, CT 06516, EE.UU. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| fuente | 1..1370 |

PATENTES Y MARCAS
ING. ... SAN
C. ... n. 113
Teléf. 5... MADRID

571

```
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            18..1355
                     /gene="NPYR5"
     CDS             18..1355
                     /gene="NPYR5"
                     /function="G protein-coupled receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y5 receptor"
                     /protein_id="AAC50741.1"
                     /db_xref="PID:g1620656"
                     /db_xref="GI:1620656"
                     /translation="MDLELDEYYNKTLATENNTAATRNSDFPVWDDYKSSVDDLQYFL
                     IGLYTFVSLLGFMGNLLILMALMKKRNQKTTVNFLIGNLAFSDILVVLFCSPFTLTSV
                     LLDQWMFGKVMCHIMPFLQCVSVLVSTLILISIAIVRYHMIKHPISNNLTANHGYFLI
                     ATVWTLGFAICSPLPVFHSLVELQETFGSALLSSRYLCVESWPSDSYRIAFTISLLLV
                     QYILPLVCLTVSHTSVCRSISCGLSNKENRLEENEMINLTLHPSKKSGPQVKLSGSHK
                     WSYSFIKKHRRRYSKKTACVLPAPERPSQENHSRILPENFGSVRSQLSSSSKFIPGVP
                     TCFEIKPEENSDVHELRVKRSVTRIKKRSRSVFYRLTILILVFAVSWMPLHLFHVVTD
                     FNDNLISNRHFKLVYCICHLLGMMSCCLNPILYGFLNNGIKADLVSLIHCLHM"
```

RECUENTO DE BASES 392 a, 263 c, 257 g, 458 t

ORIGEN

```
        1 ccaagcagga ctataatatg gatttagagc tcgacgagta ttataacaag acacttgcca
       61 cagagaataa tactgctgcc actcggaatt ctgatttccc agtctgggat gactataaaa
      121 gcagtgtaga tgacttacag tattttctga ttgggctcta tacatttgta agtcttcttg
      181 gctttatggg gaatctactt attttaatgg ctctcatgaa aaagcgtaat cagaagacta
```

MORENO
113
ADRID

```
 241 cggtaaactt cctcataggc aatctggcct tttctgatat cttggttgtg ctgttttgct
 301 cacctttcac actgacgtct gtcttgctgg atcagtggat gtttggcaaa gtcatgtgcc
 361 atattatgcc ttttcttcaa tgtgtgtcag ttttggtttc aactttaatt ttaatatcaa
 421 ttgccattgt caggtatcat atgataaaac atccccatatc taataattta acagcaaacc
 481 atggctactt tctgatagct actgtctgga cactaggttt tgccatctgt tctccccttc
 541 cagtgtttca cagtcttgtg gaacttcaag aaacatttgg ttcagcattg ctgagcagca
 601 ggtatttatg tgttgagtca tggccatctg attcatacag aattgccttt actatctctt
 661 tattgctagt tcagtatatt ctgcccttag tttgtcttac tgtaagtcat acaagtgtct
 721 gcagaagtat aagctgtgga ttgtccaaca aagaaaacag acttgaagaa aatgagatga
 781 tcaacttaac tcttcatcca tccaaaaaga gtgggcctca ggtgaaactc tctggcagcc
 841 ataaatggag ttattcattc atcaaaaaac acagaagaag atatagcaag aagacagcat
 901 gtgtgttacc tgctccagaa agaccttctc aagagaacca ctccagaata cttccagaaa
 961 actttggctc tgtaagaagt cagctctctt catccagtaa gttcatacca ggggtcccca
1021 cttgctttga gataaaacct gaagaaaatt cagatgttca tgaattgaga gtaaaacgtt
1081 ctgttacaag aataaaaaag agatctcgaa gtgttttcta cagactgacc atactgatat
1141 tagtatttgc tgttagttgg atgccactac accttttcca tgtggtaact gattttaatg
1201 acaatcttat ttcaaatagg catttcaagt cggtgtattg catttgtcat ttgttgggca
1261 tgatgtcctg ttgtcttaat ccaattctat atgggtttct taataatggg attaaagctg
1321 atttagtgtc ccttatacac tgtcttcata tgtaataatt ctcactgttt
```

## 8. VIP

| | |
|---|---|
| LOCUS | VIP 1511 pb mRNA PRI 19-mar-1999 |
| DEFINICION | mRNA del péptido intestinal vasoactivo de Homo sapiens. |
| ACCESO | NM_003381 |
| NID | g4507896 |
| VERSION | NM_003381.1 GI:4507896 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |

MORENO
MAN
113
DRID
Te

| | |
|---|---|
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1511) |
| AUTORES | DeLamarter, J.F., Buell, G.N., Kawashima, E., Polak, J.M. y Bloom, S.R. |
| TITULO | Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in bacterial cells |
| REVISTA | Peptides 6 Supl. 1, 95-102 (1985) |
| MEDLINE | 86016352 |
| COMENTARIO | REFSEQ: Esta secuencia de referencia se derivó de M36634.<br>RefSeq PROVISIONAL: Esta es un regitro de secuencia de referencia provisional que no ha sido sujeto todavía a revisión humana. El registro de secuencia de referencia refinado final puede ser algo diferente de este. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| fuente | 1..1511<br>/organism="Homo sapiens"<br>/db_xref="taxon:9606"<br>/map="6q24-q27"<br>/tissue_type="pancreatic tumor" |
| gene | 1..1511<br>/gene="VIP"<br>/db_xref="MIM:192320"<br>/db_xref="LocusID:7432" |
| sig_peptide | 67..129<br>/product="vasoactive intestinal peptide" |
| CDS | 67..579 |

MORENO
ALEMAN
MADRID

574

```
                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331
```

RECUENTO DE BASES 541 a, 255 c, 276 g, 439 t

```
   1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
  61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
 121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
 181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
 241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
 301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
 361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
 421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
 481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
 541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
 601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
 661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
 721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
 781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
 841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
 901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
 961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
1081 ataaaaagac attcttccaa aaagatttct agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1501 aaaaaaaaaa a
```

FAT[illegible] MORENO
[illegible] ALEMAN
[illegible] RID

**9. Receptor de VPAC1**

| | |
|---|---|
| LOCUS | VIP 1511 pb mRNA PRI 19-mar-1999 |
| DEFINICION | mRNA del péptido intestinal vasoactivo de Homo sapiens. |
| ACCESO | NM_003381 |
| NID | g4507896 |
| VERSION | NM_003381.1 GI:4507896 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1511) |
| AUTORES | DeLamarter, J.F., Buell, G.N., Kawashima, E., Polak, J.M. y Bloom, S.R. |
| TITULO | Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in bacterial cells |
| REVISTA | Peptides 6 Supl. 1, 95-102 (1985) |
| MEDLINE | 86016352 |
| COMENTARIO | REFSEQ: Esta secuencia de referencia se derivó de M36634.<br>RefSeq PROVISIONAL: Esta es un regitro de secuencia de referencia provisional que no |

MORENO
113
MADRID

ha sido sujeto todavía a revisión humana. El registro de secuencia de referencia refinado final puede ser algo diferente de este.

```
CARACTERISTICAS           Localización/Cualificadores
fuente             1..1511
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
  gene               1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
  sig_peptide        67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
  CDS                67..579

                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
  mat_peptide        307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
  mat_peptide        439..522
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
  polyA_signal       1326..1331
```

MORENO
113
MADRID

577

RECUENTO DE BASES 541 a, 255 c, 276 g, 439 t

ORIGEN

```
   1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
  61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
 121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
 181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
 241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
 301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
 361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
 421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
 481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
 541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
 601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
 661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
 721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
 781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
 841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
 901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
 961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
1081 ataaaaagac attcttccaa aaagatttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1501 aaaaaaaaaa a
```

## 10. Receptor de VPAC2

| | |
|---|---|
| LOCUS | HUMHVRP 1640 pb mRNA PRI 16-feb-1995 |
| DEFINICION | mRNA del receptor de VIP preferente de helodermina humano (receptor VIP2/PACAP) |
| ACCESO | L36566 |
| NID | g550477 |

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

| | |
|---|---|
| VERSION | L36566.1 GI:550477 |
| PALABRAS CLAVE | Receptor de PACAP, receptor de VIP, receptor de VIP preferente de helodermina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1640) |
| AUTORES | Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., J., Goosens, J.F., De Neef, P., Waelbroeck, M., y Robberecht, P. |
| TITULO | Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts |
| REVISTA | Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (3), 1617-1624 (1994) |
| MEDLINE | 95110300 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| fuente | 1..1640 |

PATRICIA [illegible] MORENO

```
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_line="SUP T1 lymphoblast"
                     /clone_lib="lamda ZAP II"
     sig_peptide     163..231
                     /note="putative; putative"
     CDS             163..1479
                     /note="human VIP2 receptor was previously called
                     'helodermin-preferring VIP receptor'; transmembrane
                     domains are located at positions: 637-696; 772-844;
                     880-948; 1003-1071; 1147-1209; 1243-1302.; Potential
                     glycosylation sites are located at :334-336; 424-426;
                     436-438."
                     /codon_start=1
                     /function="VIP and PACAP receptor"
                     /protein_id="AAC37569.1"
                     /db_xref="PID:g550478"
                     /db_xref="GI:550478"
                     /translation="MRTLLPPALLTCWLLAPVNSIHPECRFHLEIQEEETKCTELLRS
                     QTEKHKACSGVWDNITCWRPANVGETVTVPCPKVFSNFYSKAGNISKNCTSDGWSETF
                     PDFVDACGYSDPEDESKITFYILVKAIYTLGYSVSLMSLATGSIILCLFRKLHCTRNY
                     IHLNLFLSFILRAISVLVKDDVLYSSSGTLHCPDQPSSWVGCKLSLVFLQYCIMANFF

                     WLLVEGLYLHTLLVAMLPPRRCFLAYLLIGWGLPTVCIGAWTAARLYLEDTGCWDTND
                     HSVPWWVIRIPILISIIVNFVLFISIIRILLQKLTSPDVGGNDQSQYKRLAKSTLLLI
                     PLFGVHYMVFAVFPISISSKYQILFELCLGSFQGLVVAVLYCFLNSEVQCELKRKWRS
                     RCPTPSASRDYRVCGSSFSHNGSEGALQFHRASRAQSFLQTETSVI"
     mat_peptide     232..1476
                     /function="VIP and PACAP receptor"
```

RECUENTO DE BASES 315 a, 512 c, 461 g, 352 t

580

ORIGEN

```
   1 cgggacgagg gggcggcccc cgcgctcggg gcgctcggct acagctgcgg ggcccgaggt
  61 ctcccgcgcac tcgctcccgg cccatgctgg aggcggcgga acccggggga cctaggacgg
 121 aggcggcggg cgctgggcgg cccccggcac gctgagctcg ggatgcggac gctgctgcct
 181 cccgcgctgc tgacctgctg gctgctcgcc cccgtgaaca gcattcaccc agaatgccga
 241 tttcatctgg aaatacagga ggaagaaaca aaatgtacag agcttctgag gtctcaaaca
 301 gaaaaacaca aagcctgcag tggcgtctgg gacaacatca cgtgctggcg gcctgccaat
 361 gtgggagaga ccgtcacggt gccctgccca aaagtcttca gcaatttta cagcaaagca
 421 ggaaacataa gcaaaaactg tacgagtgac ggatggtcag agacgttccc agatttcgtc
 481 gatgcctgtg gctacagcga cccggaggat gagagcaaga tcacgtttta tattctggtg
 541 aaggccattt ataccctggg ctacagtgtc tctctgatgt ctcttgcaac aggaagcata
 601 attctgtgcc tcttcaggaa gctgcactgc accaggaatt acatccacct gaacctgttc
 661 ctgtccttca tcctgagagc catctcagtg ctggtcaagg acgacgttct ctactccagc
 721 tctggcacgt tgcactgccc tgaccagcca tcctcctggg tgggctgcaa gctgagcctg
 781 gtcttcctgc agtactgcat catggccaac ttcttctggc tgctggtgga ggggctctac
 841 ctccacaccc tcctggtggc catgctcccc cctagaaggt gcttcctggc ctacctcctg
 901 atcggatggg gcctccccac cgtctgcatc ggtgcatgga ctgcggccag gctctactta
 961 gaagacaccg gttgctggga tacaaacgac cacagtgtgc cctggtgggt catacgaata
1021 ccgattttaa tttccatcat cgtcaatttt gtccttttca ttagtattat acgaattttg
1081 ctgcagaagt taacatcccc agatgtcggc ggcaacgacc agtctcagta caagaggctg
1141 gccaagtcca cgctcctgct tatcccgctg ttcggcgtcc actacatggt gtttgccgtg
1201 tttcccatca gcatctcctc caaataccag atactgtttg agctgtgcct cgggtcgttc
1261 cagggcctgg tggtggccgt cctctactgt ttcctgaaca gtgaggtgca gtgcgagctg
1321 aagcgaaaat ggcgaagccg gtgcccgacc ccgtccgcga gccgggatta cagggtctgc
1381 ggttcctcct tctcccacaa cggctcggag ggcgccctgc agttccaccg cgcgtcccga
1441 gcccagtcct tcctgcaaac ggagacctcg gtcatctagc cccacccctg cctgtcggac
1501 gcggcgggag gcccacggtt cggggcttct gcggggctga gacgccggct tcctccttcc
1561 agatgcccga gcaccgtgtc gggcaggtca gcgcggtcct gactccgtca agctggttgt
1621 ccactaaacc ccatacctgg
```

PATRICIA MOSS MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
MADRID

ABREVIATURAS

FSD = disfunción sexual femenina

FSAD = trastorno de la excitación sexual femenina

cAMP = 3',5'-monofosfato de adenosina cíclica

cGMP = 3',5'-monofosfato de guanosina cíclica

$P_{cAMP}$ = potenciador de cAMP

$P_{cGMP}$ = potenciador de cGMP

$A_{cAMP}$ = activador de cAMP

$A_{cGMP}$ = activador de cGMP

$AM_{cAMP}$ = modulador adverso de cAMP

$AM_{cGMP}$ = modulador adverso de cGMP

$I_{cAMP}$ = inhibidor de cAMP

$I_{cGMP}$ = inhibidor de cGMP

$I{:}I_{cAMP}$ = inhibidor de un inhibidor de cAMP

$I{:}I_{cGMP}$ = inhibidor de un inhibidor de cGMP

$I{:}AM_{cAMP}$ = inhibidor de un modulador adverso de cAMP

$I{:}AM_{cGMP}$ = inhibidor de un modulador adverso de cGMP

$U{:}A_{cAMP}$ = sobrerregulador de un activador de cAMP

$U{:}A_{cGMP}$ = sobrerregulador de un activador de cGMP

[illegible] MORENO [illegible]

AC = adenilato ciclasa

A:AC = activador de AC

NEP = endopeptidasa neutra

I:NEP = inhibidor de NEP

VIP = péptido intestinal vasoactivo

VIPr = receptor de VIP (puede expresarse como VIPR)

VIP$_n$ = receptor de un subtipo de VIP (como VIPR1, VIPR2)

A:VIPr = activador de VIPr

A:VIP$_n$ = activador de VIP$_n$

I:VIPr = inhibidor de VIPr

I:VIP$_n$ = inhibidor de VIP$_n$

I:I:VIPr = inhibidor de un inhibidor de VIPr

I:I:VIP$_n$ = inhibidor de un inhibidor de VIP$_n$

PDE = fosfodiesterasa

PDEn = familia de las PDE (por ejemplo PDE1, PDE2, etc.)

PDE$_{cAMP}$ = PDE hidrolizante de cAMP

PDE$_{cGMP}$ = PDE hidrolizante de cGMP

I:PDE = inhibidor de una PDE

I:PDE$_{cAMP}$ = inhibidor de una PDE hidrolizante de cAMP

I:PDE$_{cAMP}$ = inhibidor de una familia de PDE capaz de hidrolizar cAMP

NPY = neuropéptido Y
NPYr = receptor de NPY (puede expresarse como NPYR)
NPY $Y_n$ = subtipo de receptor $Y_n$ de NPY (por ejemplo NPY $Y_1$) (por ejemplo NPYR1)
I:NPY = inhibidor de NPY
I:NPY $Y_n$ = inhibidor de NPY $Y_n$ (donde n denota el subtipo de receptor de NPY)

kDa = kilodalton
pb = par de bases
kb = kilopar de bases

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso consiguiente en el tratamiento de FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el agente es un mediador de la vasorrelajación vaginal.

3. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 o 2, en la que la composición es para administración oral.

4. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

5. El uso según la reivindicación 4, en el que el agente es un mediador de la vasorrelajación vaginal.

6. El uso según las reivindicaciones 4 o 5, en la que el mediamento es para administración oral.

7. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

8. Un procedimiento según la reivindicación 7 en el que el agente es un mediador de la vasorrelajación vaginal.

9. Un procedimiento según las reivindicaciones 7 u 8, en la que el agente se administra oralmente.

10. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto un agente con cAMP y medir la actividad de cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de FSAD.

[illegible] MORENO
[illegible] Y ALEMAN
[illegible] 113
[illegible]DRID
Tel.

586

11. Un procedimiento que comprende las etapas de:

(a) realizar el ensayo según la reivindicación 10.

(b) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente el cAMP, y

(c) preparar una cantidad de ese o esos agentes identificados.

12. Un procedimiento de tratamiento de FSAD, por potenciación de cAMP in vivo con un agente,

siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP en un procedimiento de ensayo in vitro,

siendo el procedimiento de ensayo in vitro el procedimiento de ensayo definido en la reivindicación 10.

13. El uso de un agente en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de FSAD, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP cuando se ensaya in vitro en un procedimiento de ensayo según la reivindicación 10.

[illegible] MORENO
[illegible] ALEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

14. Un agente identificado por el procedimiento de ensayo según la reivindicación 10.

15. Un agente según la reivindicación 14 para uso en medicina.

16. Un agente según la reivindicación 14 para uso en el tratamiento de FSAD.

17. Un medicamento de administración oral para tratar FSAD, comprendiendo el medicamento el agente según la reivindicación 14.

18. Un procedimiento de diagnóstico, comprendiendo el procedimiento aislar una muestra de una hembra, determinar si la muestra contiene una entidad presente en una cantidad que produzca FSAD, o si está en una cantidad tal para producir FSAD, teniendo la entidad un efecto directo o indirecto sobre el nivel o la actividad de cAMP en los genitales sexuales de la hembra.

19. Una composición de diagnóstico o estuche que comprende medios para detectar una entidad en una muestra aislada de una hembra, pudiendo utilizarse los medios para determinar si la muestra contiene una entidad presente en una cantidad

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

que produzca FSAD, o si está en una cantidad tal para producir FSAD, teniendo la entidad un efecto directo o indirecto sobre el nivel o la actividad de cAMP en los genitales sexuales de la hembra.

20. Un modelo animal utilizado para identificar agentes capaces de tratar FSAD, comprendiendo el citado modelo un animal hembra anestesiado, incluyendo los medios para medir los cambios en el flujo sanguíneo vaginal del citado animal a continuación de la estimulación del nervio pélvico de éste.

21. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: administrar un agente al modelo animal de la reivindicación 20, y medir cualquier potenciación de cAMP y/o aumento en el flujo sanguíneo vaginal del citado animal.

22. Un agente identificado por el procedimiento de ensayo de la reivindicación 21.

[illegible] LEMAN
[illegible] 115
[illegible] MADRID

589

## RESUMEN

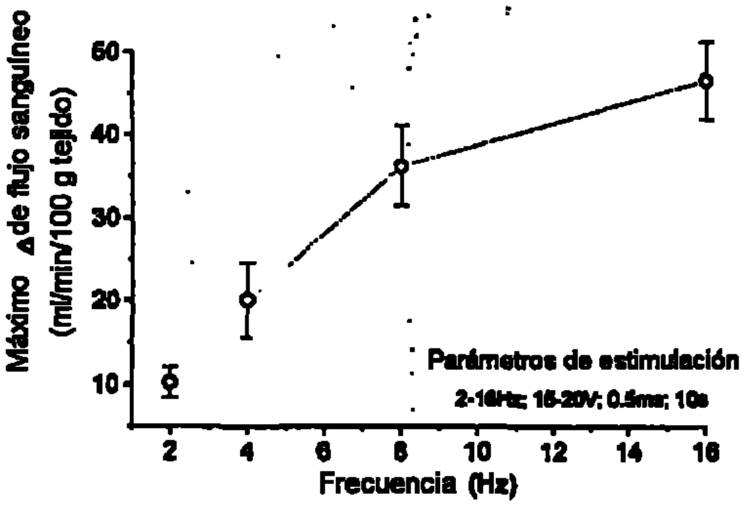
## PRODUCTO FARMACEUTICO

Se describe un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD. El procedimiento comprende suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad tal que produzca la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la hembra. El agente puede mezclarse con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] Y LEHMAN
[illegible] 113
MADRID

Figura 1

Flujo sanguíneo vaginal. Relación de respuesta a la frecuencia entre la estimulación del nervio pélvico y el flujo sanguíneo

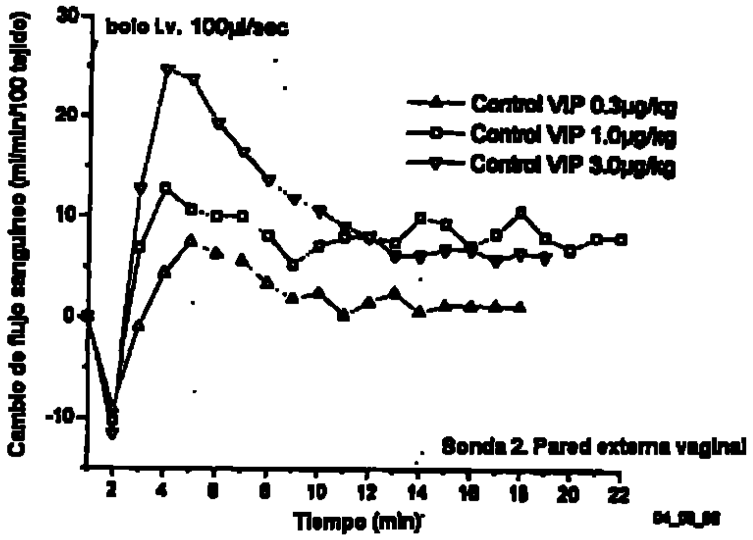


[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

## Figura 2

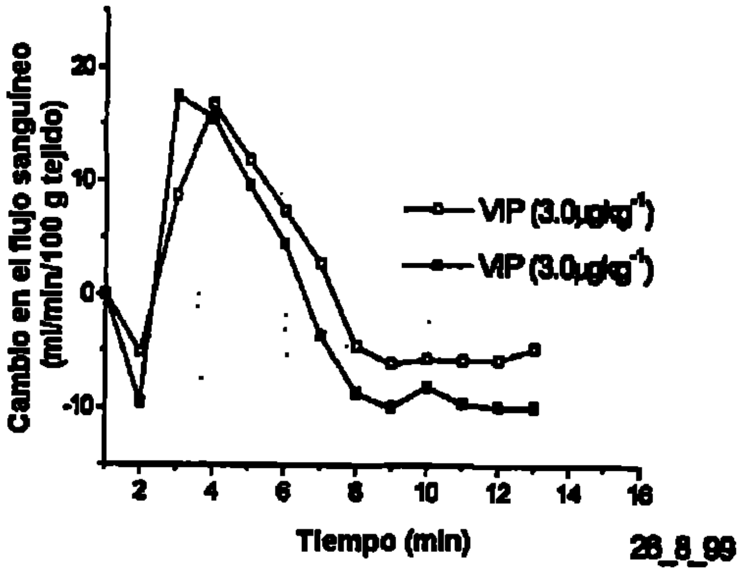
### Efecto de VIP en el flujo sanguíneo en la pared vaginal

a



### Efectos de infusiones repetidas de VIP sobre el flujo sanguíneo vaginal

b

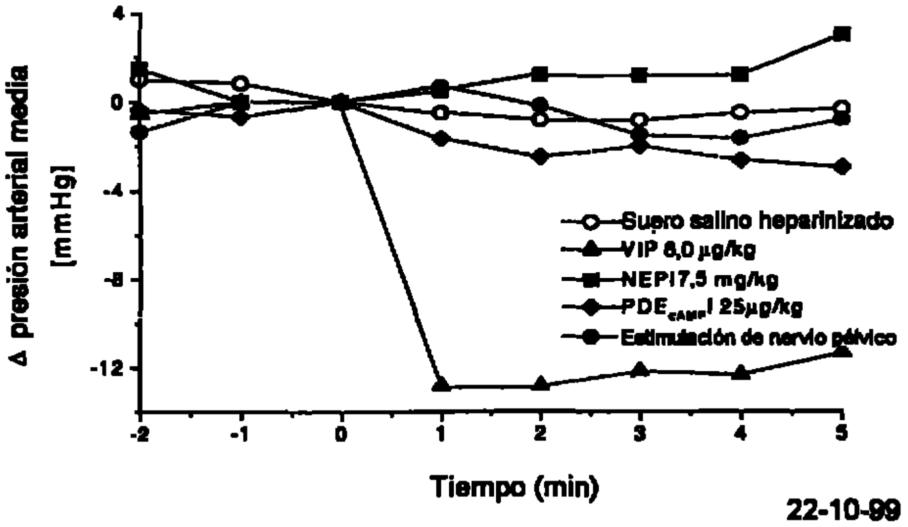


AN
113
ADRID

592

Figura 3

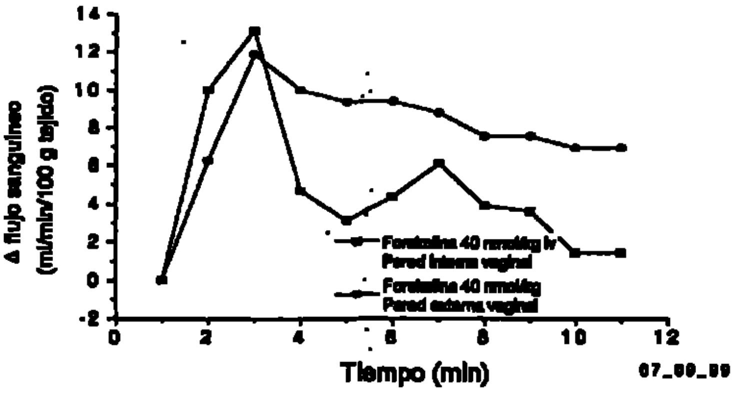
Efecto de VIP, un inhibidor de NEP, un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ o de la estimulación del nervio pélvico sobre la presión arterial media en conejo anestesiado



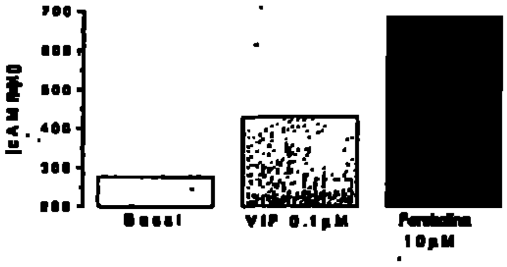
22-10-99

## Figura 4

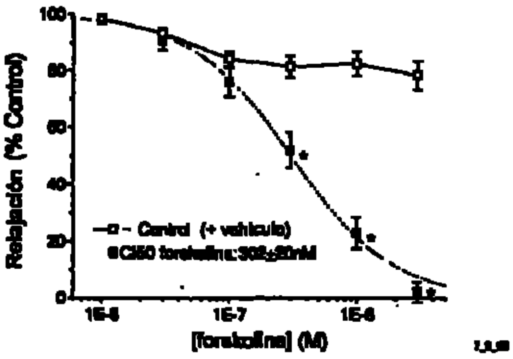
### 4a) La forskolina (un mimético de cAMP) aumenta el flujo sanguíneo vaginal en conejo anestesiado



### 4b) VIP estimula la producción de cAMP en vagina de conejo aislada

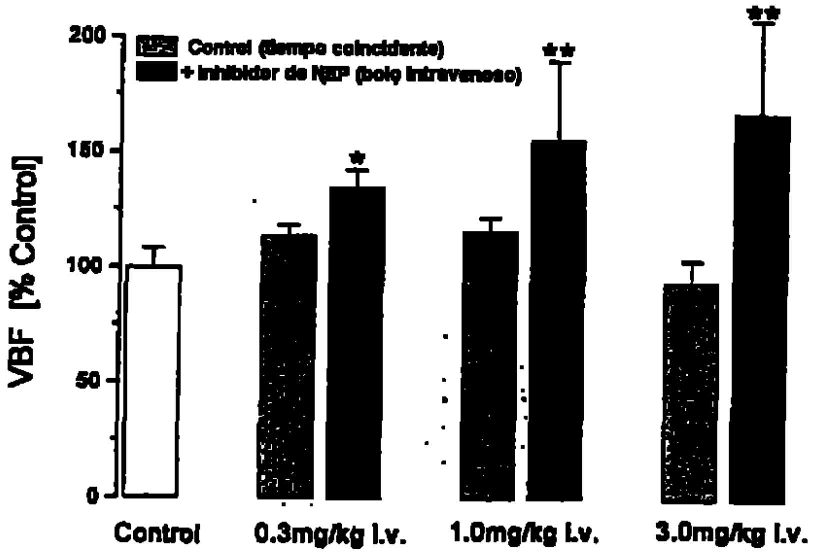


### 4c) Efecto relajante de la forskolina (un mimético de cAMP) sobre vagina de conejo aislada



PATRICIA [illegible] MORENO
Y ALEMAN
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

Figura 5

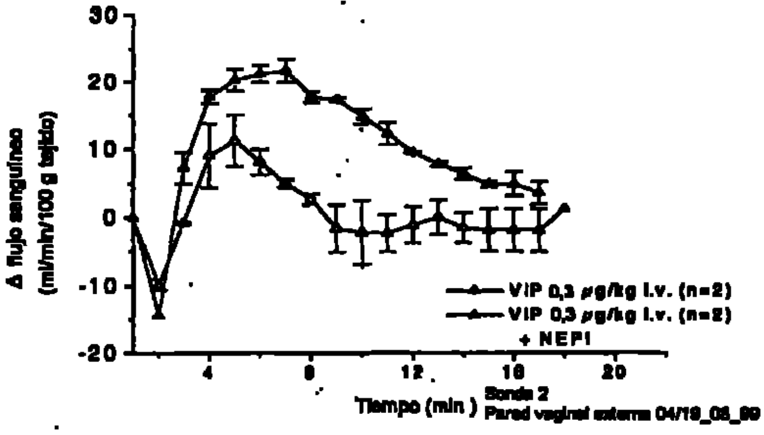


n=3; * P>0.01,** P>0.001,
Ensayo de t de Student pareado

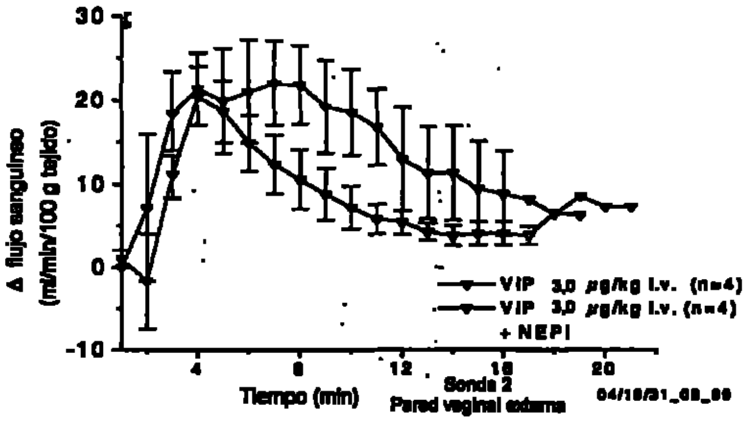
PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

## Figura 6

Efecto de VIP (0,3 μg/kg) sobre el flujo sanguíneo vaginal en presencia y ausencia de un inhibidor de NEP

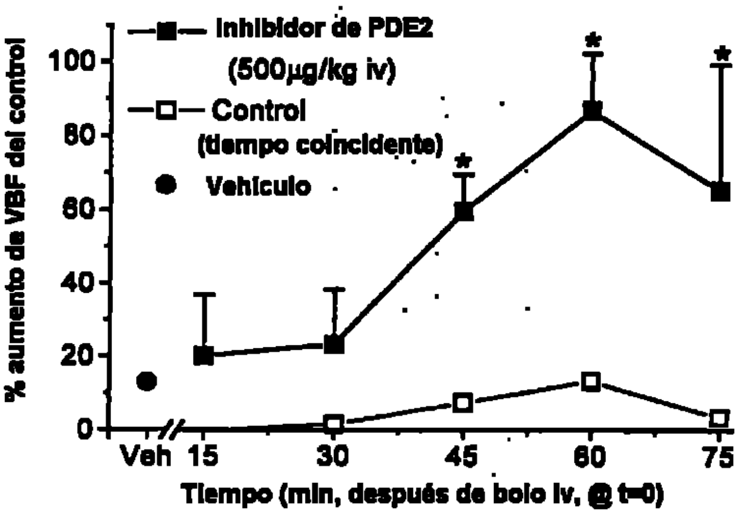


Efecto de VIP (3,0 μg/kg) sobre el flujo sanguíneo vaginal en presencia y ausencia de un inhibidor de NEP



MORENO
MAN
113
RID

Figura 7

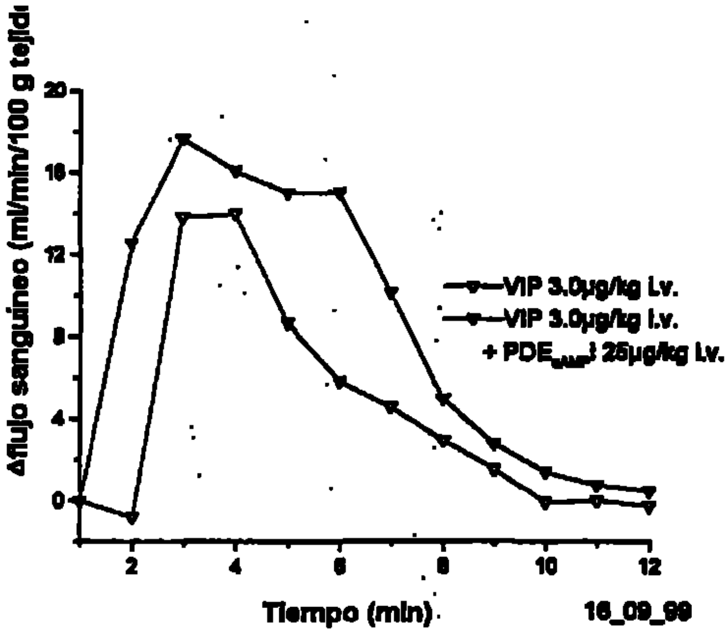


* $P>0.01$ Ensayo t de Student pareado

[illegible] ENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
Telf. [illegible]

## Figura 8

**Efecto de un inhibidor de PDE$_{cAMP}$ sobre los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo vaginal**



598

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

Doña PATRICIA KOCH MORENO, intérprete jurado de inglés y alemán, certifica que la adjunta es traducción fiel y completa al español del documento adjunto redactado en inglés.

En Madrid, a 25 OCT 2000

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

PC8105435TTRUV2

599

INVESTOR IN PEOPLE

The Patent Office
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

I, the undersigned, being an officer duly authorised in accordance with Section 74(1) and (4) of the Deregulation & Contracting Out Act 1994, to sign and issue certificates on behalf of the Comptroller-General, hereby certify that annexed hereto is a true copy of the documents as originally filed in connection with the patent application identified therein.

In accordance with the Patents (Companies Re-registration) Rules 1982, if a company named in this certificate and any accompanying documents has re-registered under the Companies Act 1980 with the same name as that with which it was registered immediately before re-registration save for the substitution as, or inclusion as, the last part of the name of the words "public limited company" or their equivalents in Welsh, references to the name of the company in this certificate and any accompanying documents shall be treated as references to the name with which it is so re-registered.

In accordance with the rules, the words "public limited company" may be replaced by p.l.c., plc, P.L.C. or PLC.

Re-registration under the Companies Act does not constitute a new legal entity but merely subjects the company to certain additional company law rules.

Signed R. Mahoney

Dated 01 AUG 2000

**Patents Form 1/77**

**Patents Act 1977**
**(Rule 16)**

The Patent Office

600

22FEB00 E515066-2 D02246
P01/7700 0.00-0004021.2

THE PATENT OFFICE
18 FEB 2000
RECEIVED BY HAND

# Request for a grant of a patent

*(See the notes on the back of this form. You can also get an explanatory leaflet from the Patent Office to help you fill in this form)*

The Patent Office

Cardiff Road
Newport
Gwent NP9 1RH

| | | |
|---|---|---|
| 1. | **Your reference** | P008448GB CTH |
| 2. | **Patent application number**<br>*(The Patent Office will fill in this part)* | 0004021.2<br>18 FEB 2000 |
| 3. | **Full name, address and postcode of the or of each applicant** *(underline all surnames)* | Pfizer Limited<br>Ramsgate Road<br>Sandwich<br>Kent<br>CT13 9NJ |
| | **Patents ADP number** *(if you know it)* | 689257300 1 |
| | **If the applicant is a corporate body, give the country/state of its incorporation** | United Kingdom |
| 4. | **Title of the invention** | PHARMACEUTICAL |
| 5. | **Name of your agent** *(if you have one)* | D YOUNG & CO |
| | **"Address for service" in the United Kingdom to which all correspondence should be sent** *(including the postcode)* | 21 NEW FETTER LANE<br>LONDON<br>EC4A 1DA |
| | **Patents ADP number** *(if you have one)* | 59006 |

6. **If you are declaring priority from one or more earlier patent applications, give the country and date of filing of the or each of these earlier applications and (if you know it) the or each application number**

| Country | Priority application number *(if you know it)* | Date of filing *(day/month/year)* |
|---|---|---|
| | | |

7. **If this application is divided or otherwise derived from an earlier UK application, give the number and filing date of the earlier application**

| Number of earlier application | Date of filing *(day/month/year)* |
|---|---|
| | |

8. **Is a statement of inventorship and of right to grant of a patent required in support of this request?** *(Answer 'Yes' if:*
*a) any applicant named in part 3 is not an inventor, or*
*b) there is an inventor who is not named as an applicant, or*
*c) any named applicant is a corporate body.*
*See note (d))*

YES

---

9. **Enter the number of sheets for any of the following items you are filing with this form. Do not count copies of the same document**

| | |
|---|---|
| **Continuation sheets of this form** | 0 |
| **Description** | 140 / |
| **Claim(s)** | 3 / a |
| **Abstract** | 1 / / |
| **Drawing(s)** | 8 x8 |

10. **If you are also filing any of the following, state how many against each item.**

| | |
|---|---|
| **Priority documents** | 0 |
| **Translations of priority documents** | 0 |
| **Statement of inventorship and right to grant of a patent** *(Patents Form 7/77)* | 0 |
| **Request for preliminary examination and search** *(Patents Form 9/77)* | 0 |
| **Request for substantive examination** *(Patents Form 10/77)* | 0 l |
| **Any other documents** *(please specify)* | LETTER / |

11. **I/We request the grant of a patent on the basis of this application.**

**Signature**
D YOUNG & CO
Agents for the Applicants

**Date**
18 Feb 00

12. **Name and daytime telephone number of the person to contact in the United Kingdom**

Dr C T Harding 023 8063 4816

## Warning

*After an application for a patent has been filed, the Comptroller of the Patent Office will consider whether publication or communication of the invention should [illegible] prohibited or restricted under Section 22 of the Patents Act 1977. You will be informed if it is necessary to prohibit or restrict your invention in this way. Furthermore, if you live in the United Kingdom, Section 23 of the Patents Act 1977 stops you from applying for a patent abroad without first getting written permission from the Patent Office unless an application has been filed at least 6 weeks beforehand in the United Kingdom for a patent for the same invention and either no direction prohibiting publication or communication has been given, or any such direction has been revoked.*

## Notes

*a) If you need help to fill in this form or you have any questions, please contact the Patent Office on 01645 500505*

*b) Write your answers in capital letters using black ink or you may type them*

*c) If there is not enough space for all the relevant details on any part of this form, please continue on a separate sheet of paper and write "see continuation sheet" in the relevant part(s). Any continuation sheet should be attached to this form.*

*d) If you answered 'Yes' Patents Form 7/77 will need to be filed.*

*e) Once you have filled in the form you must remember to sign and date it.*

*f) For details of the fee and ways to pay please contact the Patent Office.*

601

# PHARMACEUTICAL

## FIELD OF INVENTION

The present invention relates to a pharmaceutical that is useful for the treatment of female sexual dysfunction (FSD), in particular female sexual arousal dysfunction (FSAD).

The present invention also relates to a method of treatment of FSD, in particular FSAD.

The present invention also relates to assays to screen for compounds useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

For convenience, a list of abbreviations that are used in the following text is presented before the Claims section.

## FEMALE SEXUAL RESPONSE

The female sexual response phase of arousal is not easily distinguished from the phase of desire until physiological changes begin to take place in the vagina and clitoris as well as other sexual organs. Sexual excitement and pleasure are accompanied by a combination of vascular and neuromuscular events which lead to engorgement of the clitoris, labia and vaginal wall, increased vaginal lubrication and dilatation of the vaginal lumen (Levin, 1980; Ottesen, 1983; Levin, 1991; Levin, 1992; Sjoberg, 1992; Wagner, 1992; Schiavi *et al.*, 1995; Masters *et al.*, 1996; Berman *et al.*, 1999).

Vaginal engorgement enables transudation to occur and this process is responsible for increased vaginal lubrication. Transudation allows a flow of plasma through the epithelium and onto the vaginal surface, the driving force for which is increased blood flow in the vaginal capillary bed during the aroused state. In addition engorgement leads to an increase in vaginal length and luminal diameter, especially in the distal 2/3 of the vaginal canal. The luminal dilatation of the vagina is due to a combination of smooth muscle relaxation of its wall and skeletal muscle relaxation of the pelvic floor muscles. Some sexual pain disorders such as vaginismus are thought to be due, at least in part, by inadequate relaxation preventing dilatation of the vagina; it

has yet to be ascertained if this is primarily a smooth or skeletal muscle problem. (Levin, 1980; Ottesen, 1983; Levin, 1991; Levin, 1992; Sjoberg, 1992; Wagner, 1992; Schiavi *et al.*, 1995; Master *et al.*, 1996; Berman *et al.*, 1999).

The vasculature and micro vasculature of the vagina are innervated by nerves containing neuropeptides and other neurotransmitter candidates. These include calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NPY), nitric oxide synthase (NOS), substance P and vasoactive intestinal peptide (VIP) (Hoyle *et al.*, 1996). Nitric oxide synthase, which is often colocalised with VIP, displays a greater expression, immunologically, in the deep arteries and veins rather than in the blood vessels of the propria (Hoyle *et al.*, 1996).

## FEMALE SEXUAL DYSFUNCTION

It is known that some individuals can suffer from female sexual dysfunction (FSD).

FSD is best defined as the difficulty or inability of a woman to find satisfaction in sexual expression. FSD is a collective term for several diverse female sexual disorders (Leiblum, 1998, Berman *et al.*, 1999). The woman may have lack of desire, difficulty with arousal or orgasm, pain with intercourse or a combination of these problems. Several types of disease, medications, injuries or psychological problems can cause FSD. Treatments in development are targeted to treat specific subtypes of FSD, predominantly desire and arousal disorders.

The categories of FSD are best defined by contrasting them to the phases of normal female sexual response: desire, arousal and orgasm (Kaplan et al., 1979). Desire or libido is the drive for sexual expression. Its manifestations often include sexual thoughts either when in the company of an interested partner or when exposed to other erotic stimuli. Arousal is the vascular response to sexual stimulation, an important component of which is vaginal lubrication and elongation of the vagina. Orgasm is the release of sexual tension that has culminated during arousal.

Hence, FSD occurs when a woman has an inadequate or unsatisfactory response in any of these phases, usually desire, arousal or orgasm. FSD categories include hypoactive sexual desire disorder, sexual arousal disorder, orgasmic disorders and sexual pain disorders.

Hypoactive sexual desire disorder is present if a woman has no or little desire to be sexual, and has no or few sexual thoughts or fantasies. This type of FSD can be caused by low testosterone levels, due either to natural menopause or to surgical menopause. Other causes include illness, medications, fatigue, depression and anxiety.

Sexual arousal disorder (FSAD) is characterised by inadequate genital response to sexual stimulation. The genitalia do not undergo the engorgement that characterises normal sexual arousal. The vaginal walls are poorly lubricated, so that intercourse is painful. Orgasms may be impeded. Arousal disorder can be caused by reduced oestrogen at menopause or after childbirth and during lactation, as well as by illnesses, with vascular components such as diabetes and atherosclerosis. Other causes result from treatment with diuretics, antihistamines, antidepressants eg SSRIs or antihypertensive agents.

Sexual pain disorders (includes dyspareunia and vaginismus) is characterised by pain resulting from penetration and may be caused by medications which reduce lubrication, endometriosis, pelvic inflammatory disease, inflammatory bowel disease or urinary tract problems.

The prevalence of FSD is difficult to gauge because the term covers several types of problem, some of which are difficult to measure, and because the interest in treating FSD is relatively recent. Many women's sexual problems are associated either directly with the female ageing process or with chronic illnesses such as diabetes and hypertension.

There are wide variations in the reported incidence and prevalence of FSD, in part explained by the use of differing evaluation criteria, but most investigators report that a significant proportion of otherwise healthy women have symptoms of one or more of the FSD subgroups.

By way of example, studies comparing sexual dysfunction in couples reveal that 63% of women had arousal or orgasmic dysfunction compared with 40% of men have erectile or ejaculatory dysfunction (Frank *et al.*, 1978).

However, the prevalence of female sexual arousal disorder varies considerably from survey to survey. In a recent National Health and Social Life Survey 19% of women reported lubrication difficulties whereas 14% of women in an outpatient gynaecological clinic reported similar difficulties with lubrication (Rosen *et al.*, 1993).

Several studies have also reported dysfunction with sexual arousal in diabetic women (up to 47%), this included reduced vaginal lubrication (Wincze *et al.*, 1993). There was no association between neuropathy and sexual dysfunction.

Numerous studies have also shown that between 11-48% of women overall may have reduced sexual desire with age. Similarly, between 11-50% of women report problems with arousal and lubrication, and therefore experience pain with intercourse. Vaginismus is far less common, affecting approximately 1% of women.

Studies of sexually experienced women have detailed that 5-10% have primary anorgasmia. Another 10% have infrequent orgasms and a further 10% experience them inconsistently (Spector *et al.*, 1990).

Because FSD consists of several subtypes that express symptoms in separate phases of the sexual response cycle, there is not a single therapy. Current treatment of FSD focuses principally on psychological or relationship issues. Treatment of FSD is gradually evolving as more clinical and basic science studies are dedicated to the investigation of this medical problem. Female sexual complaints are not all psychological in pathophysiology, especially for those individuals who may have a component of vasculogenic dysfunction (eg FSAD) contributing to the overall female sexual complaint. There are at present no drugs licensed for the treatment of FSD. Empirical drug therapy includes oestrogen administration (topically or as hormone replacement therapy), androgens or mood-altering drugs such as buspirone or trazodone. These treatment options are often unsatisfactory due to low efficacy or unacceptable side effects.

Since interest is relatively recent in treating FSD pharmacologically, therapy consists of the following:- psychological counselling, over-the-counter sexual lubricants, and investigational candidates, including drugs approved for other conditions. These medications consist of hormonal agents, either testosterone or combinations of oestrogen and testosterone and more recently vascular drugs, that have proved effective in male erectile dysfunction. None of these agents has been demonstrated to be very effective in treating FSD.

FEMALE SEXUAL AROUSAL DISORDER (FSAD)

The Diagnostic and Statistical Manual (DSM) IV of the American Psychiatric Association defines Female Sexual Arousal Disorder (FSAD) as being:

> *"a persistent or recurrent inability to attain or to maintain until completion of the sexual activity adequate lubrication-swelling response of sexual excitement. The disturbance must cause marked distress or interpersonal difficulty."*

The arousal response consists of vasocongestion in the pelvis, vaginal lubrication and expansion and swelling of the external genitalia. The disturbance causes marked distress and/or interpersonal difficulty. Studies investigating sexual dysfunction in couples reveals that up to 63% of women have arousal or orgasmic dysfunction.

FSAD is a highly prevalent sexual disorder affecting pre-, peri- and post menopausal (±HRT) women. It is associated with concomitant disorders such as depression, cardiovascular diseases, diabetes and UG disorders.

The primary consequences of FSAD are lack of engorgement/swelling, lack of lubrication and lack of pleasurable genital sensation. The secondary consequences of FSAD are reduced sexual desire, pain during intercourse and difficulty in achieving an orgasm.

It has recently been hypothesised that there is a vascular basis for at least a proportion of patients with symptoms of FSAD (Goldstein *et al.*, 1998) with animal data supporting this view (Park *et al.*, 1997).

Drug candidates for treating FSAD, which are under investigation for efficacy, are primarily erectile dysfunction therapies that promote circulation to the male genitalia. They consist of two types of formulation, oral or sublingual medications (Apomorphine, Phentolamine, Sildenafil), and prostaglandin ($PGE_1$) that are injected or administered transurethrally in men, and topically to the genitalia in women. However, none of these therapies is that effective.

The present invention seeks to provide an effective means of treating FSAD.

## SUMMARY ASPECTS OF THE PRESENT INVENTION

The present invention is based on findings that FSAD is associated with reduced genital blood flow. Treatment of women with FSAD can be achieved by enhancement of genital blood flow with vasoactive agents. We have clearly shown that cAMP-mediates vaginal vasorelaxation and that vaginal blood flow can be enhanced/potentiated by elevation of cAMP levels. This is a seminal finding.

In this respect, no one has previously proposed that FSAD can be treated in such a way – i.e. by direct or indirect elevation of cAMP levels. Moreover, there are no teachings in the art to suggest that FSAD was associated with a detrimental modulation of cAMP activity and/or levels or that cAMP is responsible for mediating vaginal vasorelaxation. Hence, the present invention is surprising.

Thus, in a broad aspect, the present invention relates to the use of a cAMP potentiator to treat FSD, in particular FSAD.

The present invention is advantageous as it provides a means for restoring a normal sexual arousal response - namely increased genital blood flow leading to vaginal and labial engorgement. This will result in increased vaginal lubrication *via* plasma transudation, increased vaginal compliance and increased vaginal sensitivity. Hence, the present invention provides a means to restore, or mimic, the normal sexual arousal response.

## DETAILED ASPECTS OF THE PRESENT INVENTION

In one aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition for subsequent use in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

604

In another aspect, the present invention relates to the use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD.

In a further aspect, the present invention relates to a method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

In a further aspect, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In a further aspect, the present invention relates to a process comprising the steps of: (a) performing the assay according to the present invention; (b) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP activity; and (c) preparing a quantity of those one or more identified agents.

With this aspect, the agent identified in step (b) may be modified so as to, for example, maximise activity and then step (a) may be repeated. These steps may be repeated until the desired activity or pharmokinetic profile has been achieved.

Thus, in a further aspect, the present invention relates to a process comprising the steps of: (a1) performing the assay according to the present invention; (b1) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP activity, (b2) modifiying one or more of said identified agents; (a2) optionally repeating step (a1); and (c) preparing a quantity of those one or more identified agents (i.e. those that have been modified).

In a further aspect, the present invention relates to a method of treating FSD, in particular FSAD, by potentiating *in vivo* cAMP with an agent; wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP in an *in vitro* assay method; wherein the *in vitro* assay method is the assay method according to the present invention.

In a further aspect, the present invention relates to the use of an agent in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of FSD, in particular FSAD, wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP when assayed *in vitro* by the assay method according to the present invention.

In a further aspect, the present invention relates to an animal model used to identify agents capable of treating FSD (in particular FSAD), said model comprising an anaesthetised female animal including means to measure changes in vaginal blood flow of said animal following stimulation of the pelvic nerve thereof.

In a further aspect, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSAD, the assay method comprising: administering an agent to the animal model of the present invention; and measuring any potentiation of cAMP and/or increase in blood flow in the vagina of said animal.

For ease of reference, these and further aspects of the present invention are now discussed under appropriate section headings. However, the teachings under each section are not necessarily limited to each particular section.

## PREFERABLE ASPECTS

Preferably, the agent is for the treatment of FSAD.

Preferably, the agent is a mediator of vaginal vasorelaxation.

In one embodiment, preferably the agent is for oral administration.

In another embodiment, the agent may be for topical administration.

605

For some applications, preferably the agent has an indirect potentiating effect on cAMP. Alternatively expressed, for some applications, preferably the agent does not have a direct potentiating effect on cAMP. An example of an agent that has a direct potentiating effect is exogenously applied VIP. Nevertheless, it is to be understood that in this preferred aspect the agent may have an indirect potentiating effect on cAMP by acting on naturally found and laturally located directly acting agents – such as naturally found and located VIP.

For some applications, preferably the agent is an inhibitor – i.e. it is capable of exhibiting an inhibitory function.

For some applications, preferably the agent is an I:PDE (sometimes written as PDEi), more preferably an I:PDEII (sometimes written as I:PDE2 or PDEIIi or PDE2i).

For some applications, preferably the agent is a I:NEP (sometimes written as NEPi).

For some applications, preferably the agent is a I:NPY (sometimes written as NPYi).

For some applications, preferably the agent is a selective I:PDEII.

For some applications, preferably the agent is a selective I:NEP.

For some applications, preferably the agent is a selective I:NPY.

For some applications, preferably the agent does not cause - or is administered in such a fashion so that it does not cause – a prolonged drop in blood pressure (e.g. over a period of about 5 minutes or more). In this embodiment, if the agent is to be delivered topically then that agent may have the ability to cause a drop in blood pressure (such as if it were to be delivered intraveneously), provided that in the topical application minimal levels of the agent pass into the blood stream. For an oral agent, it is preferred that the agent does not cause a prolonged drop in blood pressure.

In a preferred aspect, the agent does not cause - or is administered in such a fashion so that it does not cause – a large increase in heart rate.

## POTENTIATING cAMP

As used herein with reference to cAMP, the term "potentiating" includes any one or more of: increasing the effectiveness of cAMP, increasing the levels of cAMP, increasing the activity of cAMP, decreasing the level of cAMP degradation, decreasing the level of cAMP inhibition.

The potentiating effect can be a direct effect. An example of a direct effect would be upregulation of cAMP levels by an agent that increases the expression thereof.

Alternatively, the potentiating effect could be an indirect effect. An example of such an effect would be action on a substance that would otherwise inhibit and/or reduce the levels and/or activity of cAMP. Another example of such an effect would increasing the action of a substance that increases the effectiveness of cAMP, increases the levels of cAMP, increases the activity of cAMP, decreases the level of cAMP degradation, or decreases the level of cAMP inhibition.

In the alternative, the agent may even act as a cAMP mimetic.

## cAMP Mimetic

As used herein, the term "cAMP mimetic" means an agent that can act in a similar fashion (e.g. have a similar biological profile and effect) to cAMP in the female sexual genitalia and, in doing so, does any one or more of: increases the effectiveness of cAMP like moieties, increases the levels of cAMP like moieties, increases the activity of cAMP like moieties, decreases the level of degradation of cAMP like moieties, decreases the level of inhibition of cAMP like moieties.

Thus, in one aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition for subsequent use in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

606

Thus, in another aspect, the present invention relates to the use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

Thus, in a further aspect, the present invention relates to a method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to mimic potentiation of cAMP levels in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

An example of a cAMP mimetic would be forskolin. Here we have found that forskolin increases vaginal blood flow and it can also act as a vaginal relaxant.

In a preferred aspect, the cAMP mimetic is administered orally.

## ACTIVATOR OF cAMP

As used herein, the term "activator of cAMP" means a substance that controls or releases cAMP in the female sexual genitalia. The control may be direct or indirect. For ease of reference, we refer to these substances as $A_{cAMP}$.

## TARGET

The term "target" as used herein with reference to the present invention means any substance that is cAMP, an $A_{cAMP}$, an $I_{cAMP}$, or an $AM_{cAMP}$. Otherwise expressed, the target can be referred to as a $P_{cAMP}$ target.

The target for the agent of the present invention may be an amino acid sequence and/or a nucleotide sequence encoding same and/or an expression unit responsible for the expression of same and/or a modulator of same.

The target may even be a combination of such targets.

## AGENT

The agent may be any suitable agent that can act as a $P_{cAMP}$.

The agent can be an amino acid sequence or a chemical derivative thereof. The substance may even be an organic compound or other chemical. The agent may even be a nucleotide sequence - which may be a sense sequence or an anti-sense sequence. The agent may be an antibody.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:NEP – that organic compound may typically comprise an amide group (i.e. –N(H)-C(O)- or even –C(O)-N(H)-) and one or more hydrocarbyl groups. Here, the term "hydrocarbyl group" means a group comprising at least C and H and may optionally comprise one or more other suitable substituents. Examples of such substituents may include halo-, alkoxy-, nitro-, an alkyl group, a cyclic group etc. In addition to the possibility of the substituents being a cyclic group, a combination of substituents may form a cyclic group. If the hydrocarbyl group comprises more than one C then those carbons need not necessarily be linked to each other. For example, at least two of the carbons may be linked *via* a suitable element or group. Thus, the hydrocarbyl group may contain hetero atoms. Suitable hetero atoms will be apparent to those skilled in the art and include, for instance, sulphur, nitrogen and oxygen. For some applications, preferably the agent comprises at least one cyclic group. For some applications, preferably the agent comprises at least one cyclic group linked to another hydrocarbyl group via an amide bond. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:PDE – that organic compound may typically comprise two or more linked hydrocarbyl groups. For some applications, preferably the agent comprises at least two cyclic groups – wherein one of which cyclic groups may be a fused cyclic ring structure. For some applications, preferably at least one of the cyclic groups is a heterocyclic group. For some applications, preferably the heterocyclic group comprises at least one N in the ring. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

The $P_{cAMP}$ may do any one or more of: directly or indirectly increase the effectiveness of cAMP, directly or indirectly increase the levels of cAMP, directly or indirectly increase the activity of cAMP, directly or indirectly decrease the level of cAMP degradation, directly or indirectly decrease the level of cAMP inhibition.

Preferably, the agent directly or indirectly increases cAMP levels in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

More preferably, the agent directly or indirectly selectively increases cAMP levels in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

In one aspect, the agent may inhibit or antagonise a suitable target and in doing so potentiate cAMP levels in the female sexual genitalia. In the text, we have used the term inhibitor to mean an inhibitor and/or antagonist.

In another aspect, the agent may activate or agonise a suitable target and in doing so potentiate cAMP levels in the female sexual genitalia. In the text, we have used the terms activator and upregulator inhibitor to mean activator and/or upregulator and/or agonist.

Thus, the agent may agonise, antagonise, upregulate, or inhibit a suitable target.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

Preferably, the agent may selectively agonise, selectively antagonise, selectively upregulate, or selectively inhibit a suitable target.

Preferably, the agent may selectively agonise, selectively antagonise, selectively upregulate, or selectively inhibit a selective, suitable target.

The agent of the present invention may also be capable of displaying one or more other beneficial functional properties. By way of example, the agent of the present invention may potentiate cAMP as well as potentiating cGMP. For some applications (such as a topical application), the agent may also display an ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitory action. For some applications (such as with particular patient types), such agents (i.e. those that also display ACE inhibitory action) may not be suitable for oral administration. For some applications, the agent may also display an ECE (endothelium converting enzyme) inhibitory action.

In a highly preferred embodiment, the agent is not exogenously administered VIP.

This is because there has been a report that VIP infusions lead to significant cardiovascular adverse effects such as increases in heart rate and a decrease in diastolic arterial blood pressure (Ottesen 1983, 1987, 1995)

In addition, even though, Ottesen and co-workers have demonstrated that VIP induces increases in vaginal blood flow and lubrication in healthy volunteers, the mechanism by which VIP is exerting it's effects are unclear. In the literature, there are a number of examples of VIP signalling through different second messenger systems eg cGMP/guanylate cyclase (Ashur-Fabian, 1999); carbon monoxide (CO)/heme oxygenase (Fan et al.,1998) and cAMP/adenylate cyclase (Foda,1995; Schoeffter, 1985; Gu, 1992). This is exemplified by a recent report which describes how the vasorelaxant effects of VIP in the uterine artery can be explained by the release of nitric oxide. (Jovanovic, 1998). Again, there is also evidence for VIP modulating nitric oxide (NO)/cGMP in male urogenital function (Kim, 1994).

Hence, it is desirable that the agent is not exogeneously applied VIP on its own. However, the present invention may encompass combinations of agents, wherein one of those agents is VIP. However, again, it is preferred that none of the agents is exogeneously applied VIP for the aforesaid reasons.

The agent may be used in combination with one or more other pharmaceutically active agents, such as a $P_{cGMP}$ (such as Sildenafil) and/or a centrally acting pharmaceutical (e.g. a dopamine agonist, such as apomorphine). Teachings on the use of apomorphine as a pharmaceutical may be found in US-A-5945117. In that particular document, apomorphine is delivered sub-lingually.

For some applications, preferably the agent has a $K_i$ value of less than about 100 nm, preferably less than about 75 nm, preferably less than about 50 nm, preferably less than about 25 nm, preferably less than about 20 nm, preferably less than about 15 nm, preferably 10 nm, preferably 5 nm.

For some applications, preferably the agent has a $K_b$ value of less than about 100 nm, preferably less than about 75 nm, preferably less than about 50 nm, preferably less than about 25 nm, preferably less than about 20 nm, preferably less than about 15 nm, preferably 10 nm, preferably 5 nm.

For some applications, preferably the agent has a $K_a$ value of less than about 100 nm, preferably less than about 75 nm, preferably less than about 50 nm, preferably less than about 25 nm, preferably less than about 20 nm, preferably less than about 15 nm, preferably 10 nm, preferably 5 nm.

For some applications, preferably the agent has at least about a 100 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 150 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 200 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 250 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 300 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 350 fold selectivity to the desired target.

For some applications, the agent may be a vasoactive agent.

## POTENTIATING cGMP

As used herein with reference to cGMP, the term "potentiating" includes any one or more of: increasing the effectiveness of cGMP, increasing the levels of cGMP, increasing the activity of cGMP, decreasing the level of cGMP degradation, decreasing the level of cGMP inhibition.

The potentiating effect can be a direct effect. Alternatively, it could be a secondary effect and/or a downstream effect.

Here, preferably, the agent that potentiates cGMP acts on a $I_{cGMP}$ and/or an $AM_{cGMP}$ wherein the modulator of cGMP has an adverse effect on cGMP, such that the agent reduces and/or eliminates and/or masks and/or diverts the detrimental effect of the $I_{cGMP}$ and/or the $AM_{cGMP}$ towards cGMP.

Hence, the present invention encompasses a combination of one or more $I:I_{cAMP}$ and one or more $I:I_{cGMP}$.

In one aspect, the I:I$_{cGMP}$ is a I:PDE$_{cGMP}$.

## I$_{cAMP}$ AND/OR AM$_{cAMP}$

We have shown that cAMP mediates vaginal blood flow and by enhancing cAMP signalling we can enhance vaginal blood flow in an animal model. Thus, an agent that upregulates/enhances cAMP-mediated vasorelaxation will be efficacious in the treatment of FSAD. For ease of reference, we refer to these substances as I$_{cAMP}$ and/or an AM$_{cAMP}$. Here, the I$_{cAMP}$ and the AM$_{cAMP}$ have an adverse effect on cAMP levels or activity.

Thus, the agent may be any one of more of: an I:I$_{cAMP}$ and/or an I:AM$_{cAMP}$.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

Examples of I$_{cAMP}$ and the AM$_{cAMP}$ include one or more of PDE(s), NPY and NEP, or any component associated therewith. The associated component may be, for example, a receptor and/or a co-factor.

Thus, preferably the agent may be any one of more of: an I:PDE$_{cAMP}$, an I:NPY (sometimes written as NPYi), an I:NPY Y$_n$ (sometimes written as NPY Y$_n$I), and I:NEP.

Likewise, the agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

## I:I$_{cAMP}$ AND/OR I:AM$_{cAMP}$

In accordance with the present invention we have found that it is possible to treat and/or prevent FSAD by using an agent that reduces and/or eliminates and/or masks and/or diverts and/or prevents the detrimental effect of the I$_{cAMP}$ and/or the AM$_{cAMP}$ towards cAMP. The agent may even restore cAMP levels that were decreased by the a I$_{cAMP}$ and/or a AM$_{cAMP}$. For ease, we refer to these substances as I:I$_{cAMP}$ and/or a I:AM$_{cAMP}$. Here, the I:I$_{cAMP}$ and the I:AM$_{cAMP}$ prevent or reduce the adverse effect on cAMP levels or activity.

Thus, in one preferred aspect, the agent is an I:I$_{cAMP}$ and/or an I:AM$_{cAMP}$ wherein the AM$_{cAMP}$ has a detrimental effect on AM$_{cAMP}$.

In a preferred aspect, the agent may be one or more of:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$ (where n denotes an appropriate class or sub-class)
I:NPY
I:NPY Y$_n$ (where n denotes an appropriate class or sub-class)I:NEP

A$_{cAMP}$

In accordance with the present invention, we have found that one of the important causes of FSAD is due to low levels or low activity of cAMP in the female genitalia.

Thus, the agent may be a U:A$_{cAMP}$.

Examples of A$_{cAMP}$ include VIP and AC, or any component associated therewith. The associated component may be, for example, a receptor and/or a co-factor.

Thus, preferably the agent may be any one of more of: A:AC, A:VIPr, A:VIP$_n$, I:I:VIPr or I:I:VIP$_n$.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

U:A$_{cAMP}$

In another respect, preferably, the target is a component that increases the level of cAMP. Hence, the agent can be an U:AC

By way of example, the target could be cAMP itself or AC or VIP (or combinations thereof).

Hence, by way of example, the agent can be any one of : an U:A$_{cAMP}$, an A:AC, an A:VIPr, an A:VIP$_n$, an I:I:VIPr or an I:I:VIP$_n$.

## COMBINATION OF I:I$_{cAMP}$ AND/OR I:M$_{cAMP}$ AND/OR U:A$_{cAMP}$

In another aspect, the agent of the present invention may even be a combination of cAMP potentiators. By way of example, the agent of the present invention may be two or more of:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$.

## COMBINATION OF cAMP Mimetic and I:I$_{cAMP}$ AND/OR I:M$_{cAMP}$ AND/OR U:A$_{cAMP}$

In another aspect, the agent of the present invention may even be a combination of a cAMP mimetic and one or more cAMP potentiators. By way of example, the agent of the present invention may be a cAMP mimetic and one or more of:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$

I:I:VIPr

I:I:VIP$_n$.

## INHIBITOR

The term "inhibitor" as used herein with respect to the agent of the present invention means an agent that can reduce and/or eliminate and/or mask and/or prevent the detrimental action of a $I_{cAMP}$ and/or a detrimental $M_{cAMP}$ towards cAMP. The inhibitor may act as an antagonist.

## ACTIVATOR

The term "activator" as used herein with respect to the agent of the present invention means an agent that can increase and/or produce and/or unmask and/or elevate and/or ensure action of cAMP and/or an $A_{cAMP}$. The activator may act as an agonist.

## OTHER ACTIVE COMPONENTS

In another aspect, the agent of the present invention may even be in combination with one or more other active components - such as one or more agents capable of potentiating cGMP.

## AMINO ACID SEQUENCE

As used herein, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "polypeptide" and/or the term "protein". In some instances, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "peptide". In some instances, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "protein".

The amino acid sequence may be prepared isolated from a suitable source, or it may be made synthetically or it may be prepared by use of recombinant DNA techniques.

In one aspect, the present invention provides an amino acid sequence that is capable of acting as a target in an assay for the identification of one or more agents and/or derivatives thereof capable of affecting the amino acid sequence in order to potentiate cAMP to treat FSAD.

## NUCLEOTIDE SEQUENCE

As used herein, the term "nucleotide sequence" is synonymous with the term "polynucleotide".

The nucleotide sequence may be DNA or RNA of genomic or synthetic or of recombinant origin. The nucleotide sequence may be double-stranded or single-stranded whether representing the sense or antisense strand or combinations thereof.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is DNA.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is prepared by use of recombinant DNA techniques (e.g. recombinant DNA).

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is cDNA.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence may be the same as the naturally occurring form for this aspect.

In one aspect, the present invention provides a nucleotide sequence encoding a substance capable of acting as a target in an assay (such as a yeast two hybrid assay) for the identification of one or more agents and/or derivatives thereof capable of affecting the substance in order to potentiate cAMP to treat FSAD.

## VARIANTS/HOMOLOGUES/DERIVATIVES

In addition to the specific amino acid sequences and nucleotide sequences mentioned herein, the present invention also encompasses the use of variants, homologue and derivatives thereof. Here, the term "homology" can be equated with "identity".

In the present context, an homologous sequence is taken to include an amino acid sequence which may be at least 75, 85 or 90% identical, preferably at least 95 or 98% identical. In particular, homology should typically be considered with respect to those regions of the sequence (such as amino acids at positions 51, 56 and 57) known to be essential for an activity. Although homology can also be considered in terms of similarity (i.e. amino acid residues having similar chemical properties/functions), in the context of the present invention it is preferred to express homology in terms of sequence identity.

Homology comparisons can be conducted by eye, or more usually, with the aid of readily available sequence comparison programs. These commercially available computer programs can calculate % homology between two or more sequences.

% homology may be calculated over contiguous sequences, i.e. one sequence is aligned with the other sequence and each amino acid in one sequence is directly compared with the corresponding amino acid in the other sequence, one residue at a time. This is called an "ungapped" alignment. Typically, such ungapped alignments are performed only over a relatively short number of residues.

Although this is a very simple and consistent method, it fails to take into consideration that, for example, in an otherwise identical pair of sequences, one insertion or deletion will cause the following amino acid residues to be put out of alignment, thus potentially resulting in a large reduction in % homology when a global alignment is performed. Consequently, most sequence comparison methods are designed to produce optimal alignments that take into consideration possible insertions and deletions without penalising unduly the overall homology score. This is achieved by inserting "gaps" in the sequence alignment to try to maximise local homology.

However, these more complex methods assign "gap penalties" to each gap that occurs in the alignment so that, for the same number of identical amino acids, a sequence alignment with as few gaps as possible - reflecting higher relatedness between the two compared sequences - will achieve a higher score than one with many gaps. "Affine gap costs" are typically used that charge a relatively high cost for the existence of a gap and a smaller penalty for each subsequent residue in the gap. This is the most commonly used gap scoring system. High gap penalties will of course produce optimised alignments with fewer gaps. Most alignment programs allow the gap penalties to be modified. However, it is preferred to use the default values when using such software for sequence comparisons. For example when using the GCG Wisconsin Bestfit package (see below) the default gap penalty for amino acid sequences is -12 for a gap and -4 for each extension.

Calculation of maximum % homology therefore firstly requires the production of an optimal alignment, taking into consideration gap penalties. A suitable computer program for carrying out such an alignment is the GCG Wisconsin Bestfit package (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Examples of other software than can perform sequence comparisons include, but are not limited to, the BLAST package (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* – Chapter 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 403-410) and the GENEWORKS suite of comparison tools. Both BLAST and FASTA are available for offline and online searching (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, pages 7-58 to 7-60). However it is preferred to use the GCG Bestfit program.

Although the final % homology can be measured in terms of identity, the alignment process itself is typically not based on an all-or-nothing pair comparison. Instead, a scaled similarity score matrix is generally used that assigns scores to each pairwise comparison based on chemical similarity or evolutionary distance. An example of such a matrix commonly used is the BLOSUM62 matrix - the default matrix for the BLAST suite of programs. GCG Wisconsin programs generally use either the public default values or a custom symbol comparison table if supplied (see user manual for further details). It is preferred to use the public default values for the GCG package, or in the case of other software, the default matrix, such as BLOSUM62.

Once the software has produced an optimal alignment, it is possible to calculate % homology, preferably % sequence identity. The software typically does this as part of the sequence comparison and generates a numerical result.

The sequences may also have deletions, insertions or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent substance. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues as long as the secondary binding activity of the substance is retained. For example, negatively charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine, valine, glycine, alanine, asparagine, glutamine, serine, threonine, phenylalanine, and tyrosine.

Conservative substitutions may be made, for example according to the Table below. Amino acids in the same block in the second column and preferably in the same line in the third column may be substituted for each other:

| | | |
|---|---|---|
| ALIPHATIC | Non-polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar - uncharged | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar - charged | D E |
| | | K R |
| AROMATIC | | H F W Y |

## EXPRESSION VECTORS

The nucleotide sequence for use as the target or for expressing the target can be incorporated into a recombinant replicable vector. The vector may be used to replicate and express the nucleotide sequence in and/or from a compatible host cell. Expression may be controlled using control sequences which include promoters/enhancers and other expression regulation signals. Prokaryotic promoters and promoters functional in eukaryotic cells may be used. Tissue specific or stimuli specific promoters may be used. Chimeric promoters may also be used comprising sequence elements from two or more different promoters described above.

The protein produced by a host recombinant cell by expression of the nucleotide sequence may be secreted or may be contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. The coding sequences can be designed with signal sequences which direct secretion of the substance coding sequences through a particular prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

## FUSION PROTEINS

The target amino acid sequence may be produced as a fusion protein, for example to aid in extraction and purification. Examples of fusion protein partners include glutathione-S-transferase (GST), 6xHis, GAL4 (DNA binding and/or transcriptional activation domains) and β-galactosidase. It may also be convenient to include a proteolytic cleavage site between the fusion protein partner and the protein sequence of interest to allow removal of fusion protein sequences. Preferably the fusion protein will not hinder the activity of the target.

The fusion protein may comprise an antigen or an antigenic determinant fused to the substance of the present invention. In this embodiment, the fusion protein may be a non-naturally occurring fusion protein comprising a substance which may act as an adjuvant in the sense of providing a generalised stimulation of the immune system. The antigen or antigenic determinant may be attached to either the amino or carboxy terminus of the substance.

In another embodiment of the invention, the amino acid sequence may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, for screening of peptide libraries for agents capable of affecting the substance activity, it may be useful to encode a chimeric substance expressing a heterologous epitope that is recognized by a commercially available antibody.

## ANTIBODIES

In one embodiment of the present invention, the agent of the present invention may be an antibody. In addition, or in the alternative, the target of the present invention may be an antibody.

Antibodies may be produced by standard techniques, such as by immunisation with the substance of the invention or by using a phage display library.

For the purposes of this invention, the term "antibody", unless specified to the contrary, includes but is not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments and fragments produced by a Fab expression library. Such fragments include fragments of whole antibodies which retain their binding activity for a target substance, Fv, F(ab') and $F(ab')_2$ fragments, as well as single chain antibodies (scFv), fusion proteins and other synthetic proteins which comprise the antigen-binding site of the antibody. Furthermore, the antibodies and fragments thereof may be humanised antibodies, for example as described in substance-A-239400. Neutralizing antibodies, i.e., those which inhibit biological activity of the substance polypeptides, are especially preferred for diagnostics and therapeutics.

If polyclonal antibodies are desired, a selected mammal (e.g., mouse, rabbit, goat, horse, etc.) is immunised with an immunogenic polypeptide bearing a epitope(s) obtainable from an identified agent and/or substance of the present invention.

Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminium hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are potentially useful human adjuvants which may be employed if purified the substance polypeptide is administered to immunologically compromised individuals for the purpose of stimulating systemic defence.

Serum from the immunised animal is collected and treated according to known procedures. If serum containing polyclonal antibodies to an epitope obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention contains antibodies to other antigens, the polyclonal antibodies can be purified by immunoaffinity chromatography. Techniques for producing and processing polyclonal antisera are known in the art. In order that such antibodies may be made, the invention also provides polypeptides of the invention or fragments thereof haptenised to another polypeptide for use as immunogens in animals or humans.

Monoclonal antibodies directed against epitopes obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention can also be readily produced by one skilled in the art. The general methodology for making monoclonal antibodies by hybridomas is well known. Immortal antibody-producing cell lines can be created by cell fusion, and also by other techniques such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. Panels of monoclonal antibodies produced against orbit epitopes can be screened for various properties; i.e., for isotype and epitope affinity.

Monoclonal antibodies to the substance and/or identified agent of the present invention may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique originally described by Koehler and Milstein (1975 Nature 256:495-497), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor *et al* (1983) Immunol Today 4:72; Cote *et al* (1983) Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030) and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al* (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, pp 77-96). In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (Morrison *et al* (1984) Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855; Neuberger *et al* (1984) Nature 312:604-608; Takeda *et al* (1985) Nature 314:452-454). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (US Patent No. 4,946,779) can be adapted to produce the substance specific single chain antibodies.

Antibodies, both monoclonal and polyclonal, which are directed against epitopes obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention are particularly useful in diagnosis, and those which are neutralising are useful in passive immunotherapy. Monoclonal antibodies, in particular, may be used to raise anti-idiotype antibodies. Anti-idiotype antibodies are immunoglobulins which carry an "internal image" of the substance and/or agent against which protection is desired. Techniques for raising anti-idiotype antibodies are known in the art. These anti-idiotype antibodies may also be useful in therapy.

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in Orlandi *et al* (1989, Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837), and Winter G and Milstein C (1991; Nature 349:293-299).

Antibody fragments which contain specific binding sites for the substance may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, the $F(ab')_2$ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the $F(ab')_2$ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (Huse WD *et al* (1989) Science 256:1275-128 1).

## REPORTERS

A wide variety of reporters may be used in the assay methods (as well as screens) of the present invention with preferred reporters providing conveniently detectable signals (eg. by spectroscopy). By way of example, a reporter gene may encode an enzyme which catalyses a reaction which alters light absorption properties.

Examples of reporter molecules include but are not limited to β-galactosidase, invertase, green fluorescent protein, luciferase, chloramphenicol, acetyltransferase, β-glucuronidase, exo-glucanase and glucoamylase. Alternatively, radiolabelled or fluorescent tag-labelled nucleotides can be incorporated into nascent transcripts which are then identified when bound to oligonucleotide probes.

In one preferred embodiment, the production of the reporter molecule is measured by the enzymatic activity of the reporter gene product, such as β-galactosidase.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of the target, such as by using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the protein, are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA) and fluorescent activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilising monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on PDE polypeptides is preferred, but a competitive binding assay may be employed. These and other assays are described, among other places, in Hampton R *et al* (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul MN) and Maddox DE *et al* (1983, J Exp Med 15 8:121 1).

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic and amino acid assays. Means for producing labelled hybridisation or PCR probes for detecting the target polynucleotide sequences include oligolabelling, nick translation, end-labelling or PCR amplification using a labelled nucleotide. Alternatively, the PDE coding sequence, or any portion of it, may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3 or SP6 and labelled nucleotides.

A number of companies such as Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI), and US Biochemical Corp (Cleveland, OH) supply commercial kits and protocols for these procedures. Suitable reporter molecules or labels include those radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles and the like. Patents teaching the use of such labels include US-A-3817837; US-A-3850752; US-A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 and US-A-4366241. Also, recombinant immunoglobulins may be produced as shown in US-A-4816567.

Additional methods to quantify the expression of a particular molecule include radiolabeling (Melby PC *et al* 1993 J Immunol Methods 159:235-44) or biotinylating (Duplaa C *et al* 1993 Anal Biochem 229-36) nucleotides, coamplification of a control nucleic acid, and standard curves onto which the experimental results are interpolated. Quantification of multiple samples may be speeded up by running the assay in an ELISA format where the oligomer of interest is presented in various dilutions and a spectrophotometric or calorimetric response gives rapid quantification.

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, its presence and expression should be confirmed. For example, if the nucleotide sequence is inserted within a marker gene sequence, recombinant cells containing the same may be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a target coding sequence under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the target as well.

Alternatively, host cells which contain the coding sequence for the target and express the target coding regions may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridisation and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane-based, solution-based, or chip-based technologies for the detection and/or quantification of the nucleic acid or protein.

## GENERAL ASSAYS FOR cAMP ACTIVITY/LEVELS

The ability of a test agent to potentiate cAMP may be determined by measuring a relevant increase or decrease of a target level. In addition, or in the alternative, the ability of a test agent to potentiate cAMP may be determined by measuring a relevant increase in cAMP levels. By way of example, one may adapt the teachings of Smith *et al* 1993 (Appl. Biochem. Biotechnol. 41:189-218). There are also commercially available immunoassay kits for the measurement of cAMP (eg. Amersham International, Arlington Heights, IL and DuPont, Boston, MA). Details on a suitable cAMP assay are provided in the Experimental Section.

SCREENS

Any one or more of appropriate targets - such as an amino acid sequence and/or nucleotide sequence - may be used for identifying a $P_{cAMP}$ in any of a variety of drug screening techniques. The target employed in such a test may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The abolition of target activity or the formation of binding complexes between the target and the agent being tested may be measured.

Techniques for drug screening may be based on the method described in Geysen, European Patent Application 84/03564, published on September 13, 1984. In summary, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with a suitable target or fragment thereof and washed. Bound entities are then detected - such as by appropriately adapting methods well known in the art. A purified target can also be coated directly onto plates for use in a drug screening techniques. Alternatively, non-neutralising antibodies can be used to capture the peptide and immobilise it on a solid support.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralising antibodies capable of binding a target specifically compete with a test compound for binding to a target.

Another technique for screening provides for high throughput screening (HTS) of agents having suitable binding affinity to the substances and is based upon the method described in detail in WO 84/03564.

It is expected that the assay methods of the present invention will be suitable for both small and large-scale screening of test compounds as well as in quantitative assays.

Thus, the present invention also relates to a method of identifying agents that potentiate cAMP, the method comprising contacting a suitable target with the agent and then measuring the activity and/or levels of cAMP.

The present invention also relates to a method of identifying agents that selectively potentiate cAMP in female sexual genitalia, the method comprising contacting a suitable target from female sexual genitalia and then measuring the activity and/or levels of cAMP.

The present invention also relates to a method of identifying agents that potentiate cAMP, the method comprising contacting a suitable target with the agent and then measuring the activity and/or levels of the target.

The present invention also relates to a method of identifying agents that selectively potentiate cAMP in female sexual genitalia, the method comprising contacting a suitable target from female sexual genitalia and then measuring the activity and/or levels of the target.

In a preferred aspect, the screen of the present invention comprises at least the following steps (which need not be in this same consecutive order): (a) conducting an *in vitro* screen to determine whether a candidate agent has the relevant activity (such as modulation of PDEII and/or NEP, such as NEP from dog kidney); (b) conducting one or more selectivity screens to determine the selectivity of said candidate agent (e.g. to see if said agent is also an ACE inhibitor); and (c) conducting an *in vivo* screen with said candidate agent (e.g. using a functional animal model). Typically, if said candidate agent passes screen (a) and screen (b) then screen (c) is performed.

## DIAGNOSTICS

The present invention also provides a diagnostic composition or kit for the detection of a pre-disposition for FSAD. In this respect, the composition or kit will comprise an entity that is capable of indicating the presence of one or more - or even the absence of one or more - of the targets in a test sample. Preferably, the test sample is obtained from the female sexual genitalia or a secretion thereof or therefrom.

By way of example, the diagnostic composition may comprise any one of the nucleotide sequences mentioned herein or a variant, homologue, fragment or derivative thereof, or a sequence capable of hybridising to all or part of any one of the nucleotide sequence.

In order to provide a basis for the diagnosis of disease, normal or standard values from a target should be established. This may be accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with an antibody to a target under conditions suitable for complex formation which are well known in the art. The amount of standard complex formation may be quantified by comparing it to a dilution series of positive controls where a known amount of antibody is combined with known concentrations of a purified target. Then, standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from subjects potentially affected by FSAD. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state.

A target itself, or any part thereof, may provide the basis for a diagnostic and/or a therapeutic compound. For diagnostic purposes, target polynucleotide sequences may be used to detect and quantify gene expression in conditions, disorders or diseases in which FSAD may be implicated.

The target encoding polynucleotide sequence may be used for the diagnosis of FSAD resulting from expression of the target. For example, polynucleotide sequences encoding a target may be used in hybridisation or PCR assays of tissues from biopsies or autopsies or biological fluids, to detect abnormalities in target expression. The form of such qualitative or quantitative methods may include Southern or northern analysis, dot blot or other membrane-based technologies; PCR technologies; dip stick, pin or chip technologies; and ELISA or other multiple sample formal technologies. All of these techniques are well known in the art and are in fact the basis of many commercially available diagnostic kits.

Such assays may be tailored to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regime and may be used in animal studies, in clinical trials, or in monitoring the treatment of an individual patient. In order to provide a basis for the diagnosis of disease, a normal or standard profile for target expression should be established. This is accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with the target or a portion thereof, under conditions suitable for hybridisation or amplification. Standard hybridisation may be quantified by comparing the values obtained for normal subjects with a dilution series of positive controls run in the same experiment where a known amount of purified target is used. Standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from subjects potentially affected by a disorder or disease related to expression of the target coding sequence. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state. If disease is established, an existing therapeutic agent is administered, and treatment profile or values may be generated. Finally, the assay may be repeated on a regular basis to evaluate whether the values progress toward or return to the normal or standard pattern. Successive treatment profiles may be used to show the efficacy of treatment over a period of several days or several months.

Thus, in one aspect, the present invention relates to the use of a target polypeptide, or variant, homologue, fragment or derivative thereof, to produce anti-target antibodies which can, for example, be used diagnostically to detect and quantify target levels in an FSAD states.

The present invention further provides diagnostic assays and kits for the detection of a target in cells and tissues comprising a purified target which may be used as a positive control, and anti-target antibodies. Such antibodies may be used in solution-based, membrane-based, or tissue-based technologies to detect any disease state or condition related to the expression of target protein or expression of deletions or a variant, homologue, fragment or derivative thereof.

## PROBES

Another aspect of the subject invention is the provision of nucleic acid hybridisation or PCR probes which are capable of detecting polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding a target coding region or closely related molecules, such as alleles. The specificity of the probe, i.e., whether it is derived from a highly conserved, conserved or non-conserved region or domain, and the stringency of the hybridisation or amplification (high, intermediate or low) will determine whether the probe identifies only naturally occurring target coding sequence, or related sequences. Probes for the detection of related nucleic acid sequences are selected from conserved or highly conserved nucleotide regions of target family members and such probes may be used in a pool of degenerate probes. For the detection of identical nucleic acid sequences, or where maximum specificity is desired, nucleic acid probes are selected from the non-conserved nucleotide regions or unique regions of the target polynucleotides. As used herein, the term "non-conserved nucleotide region" refers to a nucleotide region that is unique to a target coding sequence disclosed herein and does not occur in related family members.

PCR as described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188 provides additional uses for oligonucleotides based upon target sequences. Such oligomers are generally chemically synthesized, but they may be generated enzymatically or produced from a recombinant source. Oligomers generally comprise two nucleotide sequences, one with sense orientation (5'->3') and one with antisense (3'<-5') employed under optimised conditions for identification of a specific gene or condition. The same two oligomers, nested sets of oligomers, or even a degenerate pool of oligomers may be employed under less stringent conditions for detection and/or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

The nucleic acid sequence for a target can also be used to generate hybridisation probes as previously described, for mapping the endogenous genomic sequence. The sequence may be mapped to a particular chromosome or to a specific region of the chromosome using well known techniques. These include *in situ* hybridisation to chromosomal spreads (Verma *et al* (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York City), flow-sorted chromosomal preparations, or artificial chromosome constructions such as YACs, bacterial artificial chromosomes (BACs), bacterial PI constructions or single chromosome cDNA libraries.

*In situ* hybridisation of chromosomal preparations and physical mapping techniques such as linkage analysis using established chromosomal markers are invaluable in extending genetic maps. Examples of genetic maps can be found in Science (1995; 270:410f and 1994; 265:1981f). Often the placement of a gene on the chromosome of another mammalian species may reveal associated markers even if the number or arm of a particular human chromosome is not known. New sequences can be assigned to chromosomal arms, or parts thereof, by physical mapping. This provides valuable information to investigators searching for disease genes using positional cloning or other gene discovery techniques. Once a disease or syndrome has been crudely localised by genetic linkage to a particular genomic region any sequences mapping to that area may represent associated or regulatory genes for further investigation. The nucleotide sequence of the subject invention may also be used to detect differences in the chromosomal location due to translocation, inversion, etc. between normal, carrier or affected individuals.

## HOST CELLS

The term "host cell" - in relation to the present invention includes any cell that could comprise the target for the agent of the present invention.

Thus, a further embodiment of the present invention provides host cells transformed or transfected with a polynucleotide that is or expresses the target of the present invention. Preferably said polynucleotide is carried in a vector for the replication and expression of polynucleotides that are to be the target or are to express the target. The cells will be chosen to be compatible with the said vector and may for example be prokaryotic (for example bacterial), fungal, yeast or plant cells.

The gram-negative bacterium *E. coli* is widely used as a host for heterologous gene expression. However, large amounts of heterologous protein tend to accumulate inside the cell. Subsequent purification of the desired protein from the bulk of *E.coli* intracellular proteins can sometimes be difficult.

In contrast to *E.coli*, bacteria from the genus *Bacillus* are very suitable as heterologous hosts because of their capability to secrete proteins into the culture medium. Other bacteria suitable as hosts are those from the genera *Streptomyces* and *Pseudomonas*.

Depending on the nature of the polynucleotide encoding the polypeptide of the present invention, and/or the desirability for further processing of the expressed protein, eukaryotic hosts such as yeasts or other fungi may be preferred. In general, yeast cells are preferred over fungal cells because they are easier to manipulate. However, some proteins are either poorly secreted from the yeast cell, or in some cases are not processed properly (e.g. hyperglycosylation in yeast). In these instances, a different fungal host organism should be selected.

Examples of suitable expression hosts within the scope of the present invention are fungi such as *Aspergillus* species (such as those described in EP-A-0184438 and EP-A-0284603) and *Trichoderma* species; bacteria such as *Bacillus* species (such as those described in EP-A-0134048 and EP-A-0253455), *Streptomyces* species and *Pseudomonas* species; and yeasts such as *Kluyveromyces* species (such as those described in EP-A-0096430 and EP-A-0301670) and *Saccharomyces* species. By

618

way of example, typical expression hosts may be selected from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger var. tubigenis*, *Aspergillus niger var. awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus orvzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*.

The use of suitable host cells - such as yeast, fungal and plant host cells - may provide for post-translational modifications (e.g. myristoylation, glycosylation, truncation, lapidation and tyrosine, serine or threonine phosphorylation) as may be needed to confer optimal biological activity on recombinant expression products of the present invention.

## ORGANISM

The term "organism" in relation to the present invention includes any organism that could comprise the target according to the present invention and/or products obtained therefrom. Examples of organisms may include a fungus, yeast or a plant.

The term "transgenic organism" in relation to the present invention includes any organism that comprises the target according to the present invention and/or products obtained.

## TRANSFORMATION OF HOST CELLS/HOST ORGANISMS

As indicated earlier, the host organism can be a prokaryotic or a eukaryotic organism. Examples of suitable prokaryotic hosts include *E. coli* and *Bacillus subtilis*. Teachings on the transformation of prokaryotic hosts is well documented in the art, for example see Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) and Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

If a prokaryotic host is used then the nucleotide sequence may need to be suitably modified before transformation - such as by removal of introns.

In another embodiment the transgenic organism can be a yeast. In this regard, yeast have also been widely used as a vehicle for heterologous gene expression. The species *Saccharomyces cerevisiae* has a long history of industrial use, including its use for heterologous gene expression. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* has been reviewed by Goodey et al (1987, Yeast Biotechnology, D R Berry et al, eds, pp 401-429, Allen and Unwin, London) and by King et al (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E F Walton and G T Yarronton, eds, pp 107-133, Blackie, Glasgow).

For several reasons *Saccharomyces cerevisiae* is well suited for heterologous gene expression. First, it is non-pathogenic to humans and it is incapable of producing certain endotoxins. Second, it has a long history of safe use following centuries of commercial exploitation for various purposes. This has led to wide public acceptability. Third, the extensive commercial use and research devoted to the organism has resulted in a wealth of knowledge about the genetics and physiology as well as large-scale fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*.

A review of the principles of heterologous gene expression in Saccharomyces cerevisiae and secretion of gene products is given by E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", Yeasts, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.).

Several types of yeast vectors are available, including integrative vectors, which require recombination with the host genome for their maintenance, and autonomously replicating plasmid vectors.

In order to prepare the transgenic Saccharomyces, expression constructs are prepared by inserting the nucleotide sequence of the present invention into a construct designed for expression in yeast. Several types of constructs used for heterologous expression have been developed. The constructs contain a promoter active in yeast fused to the nucleotide sequence of the present invention, usually a promoter of yeast origin, such as the GAL1 promoter, is used. Usually a signal sequence of yeast origin, such as the sequence encoding the SUC2 signal peptide, is used. A terminator active in yeast ends the expression system.

For the transformation of yeast several transformation protocols have been developed. For example, a transgenic Saccharomyces according to the present invention can be prepared by following the teachings of Hinnen et al (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929); Beggs, J D (1978, Nature, London, 275, 104); and Ito, H et al (1983, J Bacteriology 153, 163-168).

The transformed yeast cells are selected using various selective markers. Among the markers used for transformation are a number of auxotrophic markers such as LEU2, HIS4 and TRP1, and dominant antibiotic resistance markers such as aminoglycoside antibiotic markers, eg G418.

Another host organism is a plant. The basic principle in the construction of genetically modified plants is to insert genetic information in the plant genome so as to obtain a stable maintenance of the inserted genetic material. Several techniques exist for inserting the genetic information, the two main principles being direct introduction of the genetic information and introduction of the genetic information by use of a vector system. A review of the general techniques may be found in articles by Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) and Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994 17-27). Further teachings on plant transformation may be found in EP-A-0449375.

Thus, the present invention also provides a method of transforming a host cell with a nucleotide sequence that is to be the target or is to express the target. Host cells transformed with the nucleotide sequence may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the encoded protein from cell culture. The protein produced by a recombinant cell may be secreted or may be contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing coding sequences can be designed with signal sequences which direct secretion of the coding sequences through a particular prokaryotic or eukaryotic cell membrane. Other recombinant constructions may join the coding sequence to nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins (Kroll *DJ et al* (1993) DNA Cell Biol 12:441-53).

## PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising administering a therapeutically effective amount of the agent of the present invention and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipients (including combinations thereof).

The pharmaceutical compositions may be for human or animal usage in human and veterinary medicine and will typically comprise any one or more of a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, or excipient. Acceptable carriers or diluents for therapeutic use are well known in the pharmaceutical art, and are described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). The choice of pharmaceutical carrier, excipient or diluent can be selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice. The pharmaceutical compositions may comprise as - or in addition to - the carrier, excipient or diluent any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s), solubilising agent(s).

Preservatives, stabilizers, dyes and even flavoring agents may be provided in the pharmaceutical composition. Examples of preservatives include sodium benzoate, sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid. Antioxidants and suspending agents may be also used.

There may be different composition/formulation requirements dependent on the different delivery systems. By way of example, the pharmaceutical composition of the present invention may be formulated to be delivered using a mini-pump or by a mucosal route, for example, as a nasal spray or aerosol for inhalation or ingestable solution, or parenterally in which the composition is formulated by an injectable form, for delivery, by, for example, an intravenous, intramuscular or subcutaneous route. Alternatively, the formulation may be designed to be delivered by both routes.

Where the agent is to be delivered mucosally through the gastrointestinal mucosa, it should be able to remain stable during transit though the gastrointestinal tract; for example, it should be resistant to proteolytic degradation, stable at acid pH and resistant to the detergent effects of bile.

Where appropriate, the pharmaceutical compositions can be administered by inhalation, in the form of a suppository or pessary, topically in the form of a lotion, solution, cream, ointment or dusting powder, by use of a skin patch, orally in the form of tablets containing excipients such as starch or lactose, or in capsules or ovules either alone or in admixture with excipients, or in the form of elixirs, solutions or suspensions containing flavouring or colouring agents, or they can be injected parenterally, for example intravenously, intramuscularly or subcutaneously. For parenteral administration, the compositions may be best used in the form of a sterile aqueous solution which may contain other substances, for example enough salts or monosaccharides to make the solution isotonic with blood. For buccal or sublingual administration the compositions may be administered in the form of tablets or lozenges which can be formulated in a conventional manner.

Preferably, the agent is in a form that is suitable for oral delivery.

For some embodiments, preferably the agent - when in use - does not act on the central nervous system.

For some embodiments, preferably the agent - when in use - is peripherally acting.

## ADMINISTRATION

Typically, a physician will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual subject and it will vary with the age, weight and response of the particular patient. The dosages below are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited.

The compositions of the present invention may be administered by direct injection. The composition may be formulated for parenteral, mucosal, intramuscular, intravenous, subcutaneous, intraocular or transdermal administration. Depending upon the nned, the agent may be administered at a dose of from 0.01 to 30 mg/kg body weight, such as from 0.1 to 10 mg/kg, more preferably from 0.1 to 1 mg/kg body weight.

The term "administered" includes delivery by viral or non-viral techniques. Viral delivery mechanisms include but are not limited to adenoviral vectors, adeno-associated viral (AAV) vectos, herpes viral vectors, retroviral vectors, lentiviral vectors, and baculoviral vectors. Non-viral delivery mechanisms include lipid mediated transfection, liposomes, immunoliposomes, lipofectin, cationic facial amphiphiles (CFAs) and combinations thereof. The routes for such delivery mechanisms include but are not limited to mucosal, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, topical, or sublingual routes.

The term "administered" includes but is not limited to delivery by a mucosal route, for example, as a nasal spray or aerosol for inhalation or as an ingestable solution; a parenteral route where delivery is by an injectable form, such as, for example, an intravenous, intramuscular or subcutaneous route.

For some applications, preferably the agent is administered orally.

For some applications, preferably the agent is administered topically.

## ANIMAL TEST MODELS

*In vivo* models may be used to investigate and/or design therapies or therapeutic agents to treat FSAD. The models could be used to investigate the effect of various tools/lead compounds on a variety of paramaters which indicate the sexual arousal response.

There are a number of animal models for vasculogenic female sexual dysfunction (FSAD) available that could be used.

By way of example, reference may be made to invasive animal models (e.g. see Park *et al.*, 1997). Here, vaginal and clitoral haemodynamic responses can be directly recorded following pelvic nerve stimulation in normal and atherosclerotic female rabbits (a validated model of FSAD). The *in vivo* effects of cAMP potentiators - such as vasodilatory agents such as NPY antagonist or VIP agonists - can be investigated either in normal or FSAD animals.

By way of further example, reference may be made to non-invasive animal models (e.g. see the review of Goldstein *et al.*, 1998; Laan *et al.*, 1998). Here, pulsed wave Doppler ultrasonography provides a means of detecting blood flow changes in the vaginal and clitoral arteries. This model can be used to investigate vasculogenic effects during pharmacological administration of vasodilators.

Other non-invasive techniques that can be used include vaginal photoplethysmography, which provides a quantitative measure of vaginal mucosa engorgement, and vaginal thermal clearance techniques, which are based on the principle that vaginal blood flow changes can be recorded by measuring the heat transfer away from an intravaginal probe kept at a constant temperature.

In a preferred aspect, a non-invasive model of FSAD is used.

## AN ANIMAL MODEL OF SEXUAL AROUSAL

In our studies we have developed a robust reproducible model of the physiology of sexual arousal. This model uses an anaesthetised rabbit and employs Laser Doppler technologies to monitor genital blood flow whilst routinely recording cardiovascular parameters. We are capable of measuring small changes in vaginal blood flow induced by pelvic nerve stimulation or infusion of VIP in the absence and presence of test agents.

We believe that our animal model directly reflects the clinical data. Hence, this model can be used to study candidate agents for the treatment of FSAD, such as measuring enhancement of vaginal blood flow.

## PHYSIOLOGICAL MEASUREMENT OF FEMALE SEXUAL AROUSAL

In accordance with the present invention, a number of different techniques may be used for measuring clitoral and vaginal blood flow. By way of example, use may be made of vaginal photoplethysmography, vaginal heat washout technique, clitoral and vaginal contrast-enhanced MRI, clitoral/vulval laser Doppler pulsed imaging, and clitoral ultrasonography.

Quantification of vaginal lubrication may also be measured by techniques known in the art - such as (a) pre- and post-stimulation weighing of vaginal tampons, and (b) measuring the pH of vaginal fluid. With respect to the latter aspect, the normal resting acid medium in the vagina becomes more alkaline as it approaches blood pH when transudation of fluid occurs during sexual stimulation.

PDE (phosphodiesterase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is a PDE (phosphodiesterase).

It is known that cyclic nucleotides, such as cAMP and cGMP, are important intracellular second messengers. Cyclic nucleotide phosphodiesterases - otherwise known as PDEs - are a family of enzymes that catalyse the degradation of cyclic nucleotides and, in doing so, are one of the cellular components that regulate the concentration of cyclic nucleotides.

In recent years, at least seven PDE enzymes (such as PDEI - PDEVII), as well as many subtypes of these enzymes, have been defined based on substrate affinity and cofactor requirements (Beavo JA and Reifsnyder DH, Trends Pharmacol. Sci. 11:150 [1990]; Beavo J, In: Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action., Beavo J and Housley MD (Eds.). Wiley:Chichester, pp. 3-15 [1990]).

Examples of PDEs include: PDEI which is a $Ca^{2+}$/Calmodulin-dependent PDE; PDEII which is a cAMP and cGMP stimulated PDE; PDEIII which is a cGMP inhibited PDE; PDEIV which is a high affinity cAMP-specific PDE; and PDEV which is a cGMP specific PDE. PDEI etc. are sometimes called PDE type I etc. or PDE type 1 etc.

Each PDE family may contain two or more isoforms (i.e. there may be two or more PDE isoenzymes). By way of example, mammalian PDE IV, the homologue of the *Drosophila* Dunce gene (Chen CN *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 83:9313 [1986]), is known to have four isoforms in the rat (Swinnen JV *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 86:5325 [1989]). Human PDEs are also known to occur as isoforms and have splice variants. For example, the cloning of one human isoform of PDEIV from monocytes was reported in 1990 (Livi GP *et al.*, Mol. Cell. Bio., 10:2678 [1990]). By way of further example, other workers have independently cloned three splice variants of PDEIV, which are now designated hPDEIV-B1, hPDEIV-B2, and hPDEIV-B3.

Teachings on cyclic nucleotide phosphodiesterases can also be found in US-A-5932423 and US-A-5932465.

Teachings on a further cyclic nucleotide phosphodiesterase - namely CN PCDE8 - can be found in WO-A-97/35989. According to WO-A-97/35989, CN PCDE8 has two

622

isozymes - which were designated CN PCDE8A and CN PCDE8B. The term "isozyme" is sometimes referred to in the art as "isoform".

According to WO-A-97/35989, many inhibitors of different PDEs have been identified and some have undergone clinical evaluation. For example, PDEIII inhibitors are being developed as antithrombotic agents, as antihypertensive agents and as cardiotonic agents useful in the treatment of congestive heart failure. Rolipram, a PDEIII inhibitor, has been used in the treatment of depression and other inhibitors of PDEIII are undergoing evaluation as anti-inflammatory agents. Rolipram has also been shown to inhibit lipopolysaccharide (LPS) induced TNF-alpha which has been shown to enhance HIV-1 replication *in vitro*. Therefore, rolipram may inhibit HIV-1 replication (Angel *et al* 1995 AIDS 9:1137-44). Additionally, based on its ability to suppress the production of TNF alpha and beta and interferon gamma, rolipram has been shown to be effective in the treatment of encephalomyelitis, the experimental animal model for multiple sclerosis (Sommer *et al*, 1995 Nat Med 1:244-248) and may be effective in the treatment of tardive dyskinesia (Sasaki *et al*, 1995 Eur J Phamacol 282:71-76).

According to WO-A-97/35989, there are also non-specific PDE inhibitors such as theophylline, used in the treatment of bronchial asthma and other respiratory diseases, and pentoxifylline, used in the treatment of intermittent claudication and diabetes-induced peripheral vascular disease. Theophylline is thought to act on airway smooth muscle function as well as in an anti-inflammatory or immunomodulatory capacity in the treatment of respiratory diseases (Banner *et al* 1995 Respir J 8:996-1000) where it is thought to act by inhibiting both CN PDE cAMP and cGMP hydrolysis (Banner *et al* 1995 Monaldi Arch Chest Dis 50:286-292). Pentoxifylline, also known to block TNF-alpha production, may inhibit HIV-1 replication (Angel *et al supra*). A list of CN PDE inhibitors is given in Beavo 1995 *supra*.

It has been suggested that selective inhibitors of PDEs, in addition to their isozymes and their subtypes, will lead to more effective therapy with fewer side effects. For example, see the teachings in the reviews of Wieshaar RE *et al*, (J. Med. Chem., 28:537 [1985]), Giembycz MA (Biochem. Pharm., 43:2041 [1992]) and Lowe JA and Cheng JB (Drugs of the Future, 17:799-807 [1992]).

Thus, for some applications it is desirable to have a selective inhibition of an individual type of PDE.

Background teachings on PDEs have been presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning PDE2 or cGMP-stimulated PDE, has been extracted from that source.

> "Cyclic nucleotides serve as second messengers that mediate a variety of cellular responses to extracellular signals such as hormones, light, and neurotransmitters. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) play a role in signal transduction by regulating the cellular concentrations of cyclic nucleotides. Mammalian cells contain multiple PDEs that are distinguished into at least 7 families based on their substrate affinity and on their selective sensitivity to cofactors and inhibitory drugs. These families are: (I) Ca(2+)/calmodulin-dependent PDEs; (II) cGMP-stimulated PDEs; (III) cGMP-inhibited PDEs; (IV) cAMP-specific PDEs; (V) cGMP-specific PDEs; (VI) photoreceptor PDEs; and (VII) high-affinity, cAMP-specific. From the amino acid sequences, it is evident that all these PDE families contain a related domain, thought to be the catalytic domain, with approximately 30% sequence identity between families. Members of the same family are more closely related; they share 60 to 80% sequence identity throughout the entire coding region.
>
> Michaeli et al. (1993) established a highly sensitive functional screen for the isolation of cDNAs encoding cAMP phosphodiesterases by complementation of defects in the Saccharomyces cerevisiae strain lacking both endogenous cAMP PDE genes, PDE1 and PDE2. Three groups of cDNAs corresponding to 3 distinct human genes encoding cAMP-specific PDEs were isolated from a human glioblastoma cDNA library using this functional screen. Two of the genes were closely related to the Drosophila 'dunce' cAMP-specific PDE. The third gene, which Michaeli et al. (1993) referred to as HCP1, encoded a novel cAMP-specific PDE. HCP1 had an amino acid sequence related to the sequences of the catalytic domains of all cyclic nucleotide PDEs. It is a high-affinity cAMP-specific PDE that does not share other properties of the cAMP-specific PDE family, however. The PDE activity of HCP1 was not sensitive to cGMP or other inhibitors of the cGMP-inhibitable PDEs. The biochemical and pharmacologic properties of HCP1 suggested to Michaeli et al. (1993) that it is a member of a previously undiscovered cyclic nucleotide PDE family, which they designated as family VII. Northern blot analysis indicated the presence of high levels of an HCP1 RNA in human skeletal muscle.
>
> By Southern blot analysis of somatic cell hybrid lines, Milatovich et al. (1994) mapped the HCP1 locus to chromosome 8; by study of somatic cell hybrid lines that contained different regions of chromosome 8, they regionalized the assignment to 8q13-q22. Han et al. (1998) mapped the PDE7A gene to 8q13 by fluorescence in situ

> hybridization. By interspecific backcross analysis, they mapped the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3."

Background teachings on PDE2 have been presented by Jennifer P. Macke et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning PDE2 cGMP-stimulated has been extracted from that source.

> "Rosman et al. (1997) cloned a cDNA corresponding to human PDE2A. The PDE2A gene encodes a 941 amino acid polypeptide with a predicted molecular mass of 106 kD. The protein sequence is 90% identical to bovine and rat PDE2A sequences. Northern blot analysis showed that PDE2A was expressed as a 4.2-kb mRNA at varying levels in all human tissues tested, with greatest expression in brain. Expression studies revealed that PDE2A hydrolyzes cAMP and cGMP and is inhibited by the PDE2A-specific inhibitor EHNA."

Nucleotide sequences and amino acid sequences for PDEs are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

In one aspect, the PDE target is selected from any one or more of the following PDE enzymes: $\text{PDE}_{cAMP}$ 1, $\text{PDE}_{cAMP}$ 2, $\text{PDE}_{cAMP}$ 3, $\text{PDE}_{cAMP}$ 4, $\text{PDE}_{cAMP}$ 7 and $\text{PDE}_{cAMP}$ 8.

In a more preferred aspect, the PDE target is selected from any one or more of the following PDE enzymes: $\text{PDE}_{cAMP}$ 1, $\text{PDE}_{cAMP}$ 2, $\text{PDE}_{cAMP}$ 3, and $\text{PDE}_{cAMP}$ 4.

Preferably, for the present invention, the PDE to target is at least PDE 2.

I:PDE

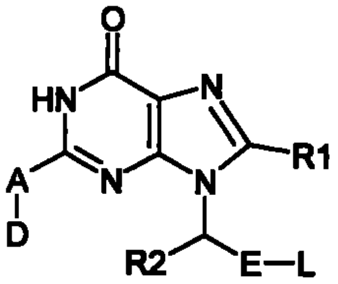
As indicated above, the agent may be any suitable agent that can act as an I:PDE.

Examples of I:PDE are disclosed in EP-A-091133 and EP-A-0771799.

Preferably, the I:PDE is an I:PDE2. Thus, preferred example compounds are those presented in EP-A-0771799.

For convenience, claim 1 of EP-A-0771799 is now repeated:

A purin-6-one derivative with general formula (I):



wherein:

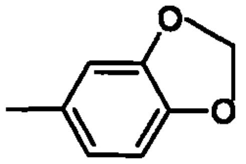
| | |
|---|---|
| $R^1$ | represents hydrogen or a linear or branched alkyl containing up to 8 carbon atoms; |
| $R^2$ | represents a linear or branched acyl containing up to 4 carbon atoms, or a linear or branched alkyl containing up to 8 carbon atoms optionally substituted by hydroxyl, azido or a group with formula $-NR^3R^4$ or $-OSO_2R^5$; wherein |
| $R^3$ and $R^4$ | are identical or different and represent a cycloalkyl containing 3 to 6 carbon atoms, hydrogen, formyl, or a linear or branched alkyl containing up to 6 carbon atoms, optionally substituted by a linear or branched alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 6 carbon atoms or by a group with formula $-(CO)_a-NR^6R^7$, wherein |
| a | is the number 0 or 1; |
| $R^6$ and $R^7$ | are identical or different and represent hydrogen, formyl, hydroxyl, phenyl or a linear or branched alkyl containing up to 6 carbon atoms, optionally substituted by hydroxyl or a linear or branched alkoxy containing up to 5 carbon atoms; or |
| $R^3$ and/or $R^4$ | represent a linear or branched alkoxycarbonyl containing up to 6 carbon atoms, carboxyl or a linear or branched acyl containing up to 6 carbon atoms optionally substituted by hydroxyl or a linear or branched alkoxy containing up to 4 carbon atoms; or |
| $R^3$ and/or $R^4$ | represent a residue with formula $-(CO)_b-T-NR^8R^9$, $-CO-R^{10}$, $-SO_2R^{11}$ or $-SO_2NR^{12}R^{13}$, wherein |

| | |
|---|---|
| b | has the meaning given above for a and is identical thereto or different therefrom; |
| T | can represent a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms, or when $b \neq 0$ it can also represent a bond; |
| $R^8$ and $R^9$ | have the meaning given for $R^6$ and $R^7$ above and are identical thereto or different therefrom; |
| $R^{10}$ | represents a saturated, partially unsaturated or unsaturated 5- to 7-membered heterocycle containing up to 3 heteroatoms selected from S, N and/or O, which can optionally also be substituted on the N function by a linear or branched alkyl, alkoxy or alkoxycarbonyl containing up to 4 carbon atoms, carboxyl, benzyloxycarbonyl or hydroxyl; |
| $R^{11}$ | represents a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms, benzyl or phenyl; |
| $R^{12}$ and $R^{13}$ | are identical or different and represent hydrogen, phenyl or a linear or branched alkyl containing up to 6 carbon atoms; or |
| $R^3$ and $R^4$ | together with the nitrogen atom form a 5- or 6-membered saturated, partially unsaturated or unsaturated heterocycle which can contain up to 3 heteroatoms selected from N, S and/or O or a $-NR^{14}$ residue, and which is optionally substituted by carbonyl, a linear or branched alkoxycarbonyl containing up to 5 carbon atoms or a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms which in its turn can be substituted by hydroxyl, carboxy or a linear or branched acyl, alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 6 carbon atoms; wherein |
| $R^{14}$ | represents hydrogen, carbonyl or a linear or branched alkyl or alkoxycarbonyl respectively containing up to 5 carbon atoms; and |
| $R^5$ | represents phenyl or a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms; |
| A | represents a linear or branched alkylene or alkenylene chain respectively containing up to 6 carbon atoms; |

| | |
|---|---|
| D and L | are identical or different and represent an aryl containing 6 to 10 carbon atoms or a 5- to 7-membered aromatic, optionally benzocondensed heterocycle containing up to 3 heteroatoms selected from S, N and/or O, optionally substituted up to 3 times, identically or differently, by a halogen, hydroxyl, nitro, trifluoromethyl, carboxy, a linear or branched alkyl, alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 6 carbon atoms or by a group with formula $-(V)_c-NR^{15}R^{16}$ and/or $-OR^{17}$; wherein |
| c | is the number 0 or 1; |
| V | represents a residue with formula $-CO$ or $-SO_2$; |
| $R^{15}$ and $R^{16}$ | are identical or different and have the meaning given for $R^3$ and $R^4$ above; |
| $R^{17}$ | represents hydrogen, a linear or branched alkenyl containing up to 8 carbon atoms or a linear or branched alkyl containing up to 8 carbon atoms, optionally substituted up to 3 times, identically or differently, with hydroxyl, carbonyl or linear or branched alkoxycarbonyl containing up to 5 carbon atoms; and/or the cycles are optionally substituted by an aryl containing 6 to 10 carbon atoms or by a 5- to 7-membered aromatic, optionally benzocondensed heterocycle containing up to 3 heteroatoms selected from S, N and/or O, which in its turn is optionally substituted up to two times, identically or differently, by a halogen, hydroxyl, nitro, carboxyl, trifluoromethyl or a linear or branched alkyl, alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 5 carbon atoms or with a group with formula$(V')_d-NR^{18}R^{19}$; wherein |
| d | has the meaning given above for a and is identical thereto or different therefrom; |
| $R^{18}$ and $R^{19}$ | have the meaning given above for $R^3$ and $R^4$ and are identical thereto or different therefrom; |

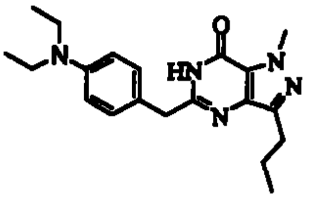
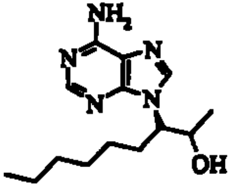
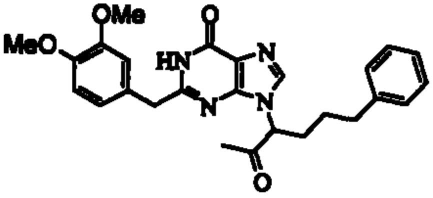
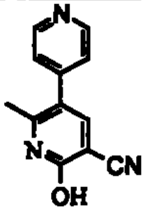
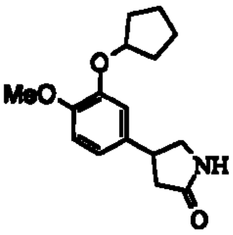
| | |
|---|---|
| V' | has the meaning given above for V and is identical thereto or different therefrom; and/or<br>represents the ring system given below for D, optionally substituted by a linear or branched acyl containing up to 5 carbon atoms, optionally substituted by hydroxyl, a linear or branched alkoxy containing up to 5 carbon atoms or by a group with formula $-NR^{20}R^{21}$; wherein |
| $R^{20}$ and $R^{21}$ | are identical or different and have the meaning given above for $R^3$ and $R^4$; or |
| E | Represents a residue with formula $-CH_2$-Y-Z-; wherein |
| Y | Represents a bond or an oxygen or sulphur atom or the group –NH-; |
| Z | Represents a linear or branched alkyl chain containing up to 5 carbon atoms; |

D represents a residue with formula



and tautomers and salts thereof.

Preferred I:PDEs are selected from the following structures:

| **Compound** | **Structure** | **Mode of action**<br>**References** |
|---|---|---|
| | | |
| **FIa** |  | I:PDE1<br>EP-A-0911333<br>(Example 50) |
| **FIb** |  | I:PDE2<br>EHNA<br>(also an inhibitor of Adenosinedeaminase) |
| FII |  | I:PDE2<br>EP-A-0771799<br>(Example 100) |
| FIII |  | I:PDE3<br>Milrinone<br>(which is commercially available) |
| FIV |  | I:PDE4<br>Rolipram<br>(which is commercially available) |

5

626 ~~/7~~

NEP (neutral endopeptidase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is NEP.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for NEP is available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

In one aspect, the NEP is NEP (EC 3.4.24.11) (also known as enkephalinase or endopeptidase-2). Here, we have found NEP EC 3.4.24.11 mRNA and expressed protein in human and rabbit vagina.

Here, we believe that in females including those suffering from FSAD, VIP is degraded by NEP EC3.4.24.11. Thus, NEP inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of VIP released during arousal. This will lead to a treatment of FSAD, such as through enhanced vaginal engorgement. We have shown that selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 enhance pelvic nerve-stimulated and VIP-induced increases in vaginal blood flow. In addition that selective NEP inhibitors enhance VIP and nerve-mediated relaxations of isolated vagina wall.

Background teachings on NEP have been presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning NEP has been extracted from that source.

> "Common acute lymphocytic leukemia antigen is an important cell surface marker in the diagnosis of human acute lymphocytic leukemia (ALL). It is present on leukemic cells of pre-B phenotype, which represent 85% of cases of ALL. CALLA is not restricted to leukemic cells, however, and is found on a variety of normal tissues. CALLA is a glycoprotein that is particularly abundant in kidney, where it is present on the brush border of proximal tubules and on glomerular epithelium. Letarte et al. (1988) cloned a cDNA coding for CALLA and showed that the amino acid sequence deduced from the cDNA sequence is identical to that of human membrane-associated neutral endopeptidase (NEP; EC 3.4.24.11 ), also known as enkephalinase. NEP cleaves peptides at the amino side of hydrophobic residues and inactivates several peptide hormones including glucagon, enkephalins, substance P, neurotensin, oxytocin, and bradykinin. By cDNA transfection analysis, Shipp et al. (1989) confirmed that CALLA is a functional neutral endopeptidase of the type that has previously been called enkephalinase. Barker et al. (1989) demonstrated that the

CALLA gene, which encodes a 100-kD type II transmembrane glycoprotein, exists in a single copy of greater than 45 kb which is not rearranged in malignancies expressing cell surface CALLA. The gene was located to human chromosome 3 by study of somatic cell hybrids and in situ hybridization regionalized the location to 3q21-q27. Tran-Paterson et al. (1989) also assigned the gene to chromosome 3 by Southern blot analysis of DNA from human-rodent somatic cell hybrids. D'Adamio et al. (1989) demonstrated that the CALLA gene spans more than 80 kb and is composed of 24 exons."

## I:NEP

As indicated above, the agent may be any suitable agent that can act as an I:NEP.

I:NEPs are discussed in the following review articles:

Pathol. Biol., 46(3), 1998, 191.
Current Pharm. Design, 2(5), 1996, 443.
Biochem. Soc. Trans., 21(3), 1993, 678.
Handbook Exp. Pharmacol., 104/1, 1993, 547.
TiPS, 11, 1990, 245.
Pharmacol. Rev., 45(1), 1993, 87.
Curr. Opin. Inves. Drugs, 2(11), 1993, 1175.
Antihypertens. Drugs, (1997), 113.
Chemtracts, (1997), 10(11), 804.
Zinc Metalloproteases Health Dis. (1996), 105.
Cardiovasc. Drug Rev., (1996), 14(2), 166.
Gen. Pharmacol., (1996), 27(4), 581.
Cardiovasc. Drug Rev., (1994), 12(4), 271.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., (1995), 22(1), 63.
Cardiovasc. Drug Rev., (1991), 9(3), 285.
Exp. Opin. Ther. Patents (1996), 6(11), 1147.

I:NEPs are disclosed in the following documents:

EP-509442A
US-192435
US-4929641
EP-599444B
US-884664
EP-544620A
US-798684
J. Med. Chem. 1993, 3821.
Circulation 1993, 88(4), 1.
EP-136883
JP-85136554
US-4722810
Curr. Pharm. Design, 1996, 2, 443.
EP-640594
J. Med. Chem. 1993, 36(1), 87.
EP-738711-A
JP-270957
CAS # 115406-23-0
DE-19510566
DE-19638020
EP-830863
JP-98101565
EP-733642
WO9614293
JP-08245609
JP-96245609
WO9415908
JP05092948
WO-9309101
WO-9109840
EP-519738
EP-690070
J. Med. Chem. (1993), 36, 2420.

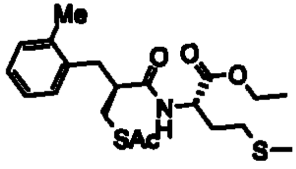
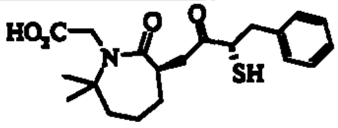
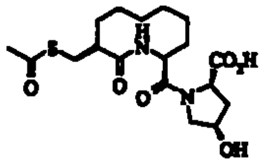
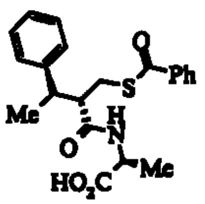
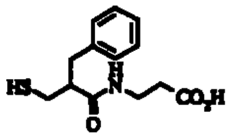
JP-95157459

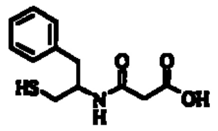
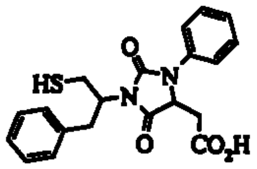
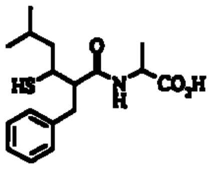
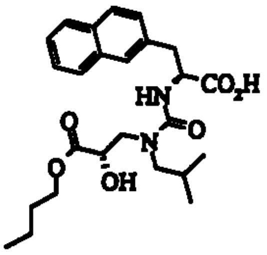
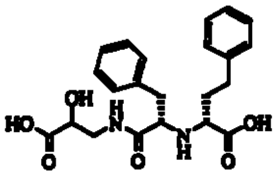
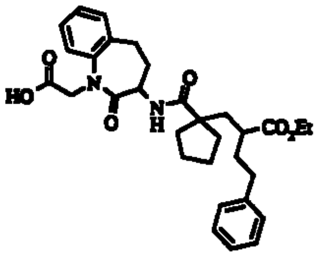
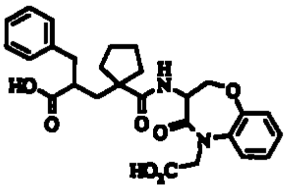
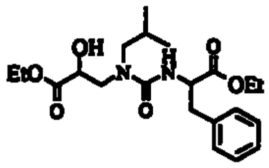
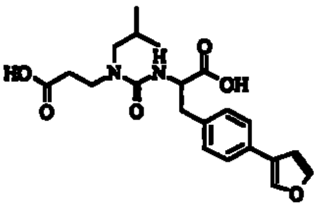
Bioorg. Med. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65.

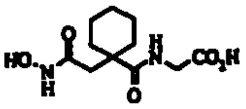
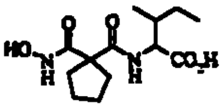
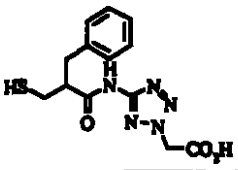
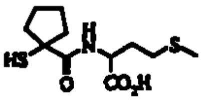
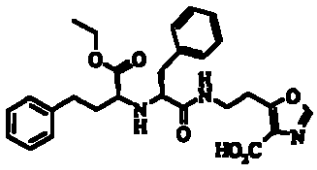
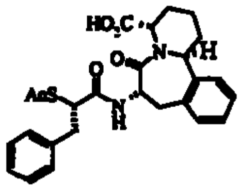
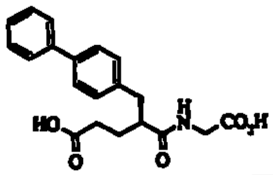
Preferred I:NEPs are disclosed in the following documents:

EP-A-0274234
JP-88165353
Biochem.Biophys.Res. Comm.,1989, 164, 58
EP-629627-A
US-77978
Perspect. Med. Chem. (1993), 45.
EP-358398-B

Preferred examples of I:NEPs are selected from the following structures:

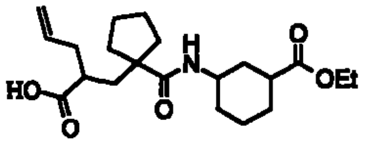
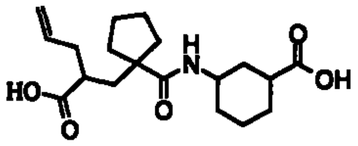
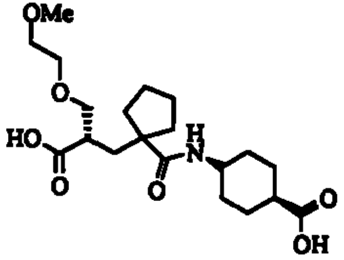
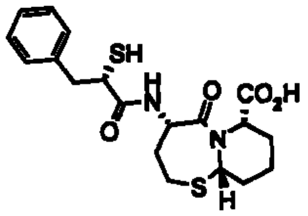
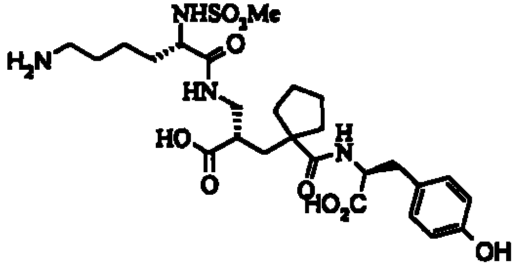
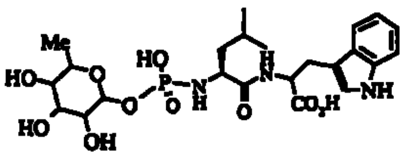
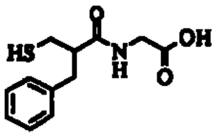
| Compound | Structure | Mode of Action<br>References |
|---|---|---|
| | | |
| FXII |  | I:NEP<br>EP-509442A<br>US-192435<br>US-4929641 |
| FXIII |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>EP-599444B<br>US-884664 |
| FXIV |  | I:NEP<br>EP-544620A<br>US-798684<br>J. Med. Chem.<br>1993, 3821. |
| FXV |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>Mixanpril<br>Circulation<br>1993, 88(4), 1. |
| FXVI |  | I:NEP<br>EP-136883<br>JP-85136554<br>US-4722810 |

| | | |
|---|---|---|
| FXVII |  | I:NEP<br>Retrothiorphan<br>Curr. Pharm. Design, 1996, 2, 443. |
| FXVIII |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>EP-640594 |
| FXIX |  | I:NEP<br>J. Med. Chem.<br>1993, 36(1), 87. |
| FXX |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>EP-738711-A<br>JP-270957 |
| FXXI |  | I:NEP<br>CAS #<br>115406-23-0 |
| FXXII |  | I:NEP<br>(also an ECE inhibitor)<br>DE-19510566<br>DE-19638020<br>EP-830863<br>JP-98101565 |
| FXXIII |  | I:NEP<br>(also an ECE inhibitor)<br>EP-733642 |
| FXXIV |  | I:NEP<br>WO96/14293 |
| FXXV |  | I:NEP<br>JP-08245609<br>JP-96245609 |

| | | |
|---|---|---|
| FXXVI |  | I:NEP<br>WO9415908 |
| FXXVII |  | I:NEP<br>JP05092948 |
| FXXVIII |  | I:NEP<br>WO-9309101 |
| FXXIX |  | I:NEP<br>WO-9109840 |
| FXXXI |  | I:NEP<br>EP-519738<br>EP-690070 |
| FXXXII |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>J. Med. Chem. (1993),<br>36, 2420. |
| FXXXIII |  | I:NEP<br>JP-95157459<br>Bioorg. Med. Chem.<br>Letts., 1996, 6(1), 65. |

629

More preferred I:NEPs are selected from the following structures:

| **Compound** | **Structure** | **Mode of Action**<br>**References** |
|---|---|---|
| | | |
| FV |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(Example 300) |
| FVI |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(Example 379) |
| FVII |  | I:NEP<br>Candoxatrilat<br>EP-274234<br>JP-88165353<br>Biochem.Biophys.Res. Comm.,1989, 164, 58 |
| FVIII |  | I:NEP<br>Omapatrilat<br>(also an inhibitor of ACE)<br>EP-0629627-A<br>US-77978 |
| FIX |  | I:NEP<br>Sampatrilat<br>(also an inhibitor of ACE)<br>Perspect. Med. Chem. (1993), 45.<br>EP-0358398-B |
| FX |  | I:NEP<br>Phosphoramidon<br>(which is commercially available) |
| FXI |  | I:NEP<br>Thiorphan<br>(which is commercially available) |

NPY (neuropeptide Y)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is NPY or one of its associated receptors.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for NPY and its receptors are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

Here, we have found that neuropeptide Y (NPY) exerts an inhibitory regulatory influence over vasoactive intestinal peptide (VIP)-mediated vasorelaxation.Thus, inhibition of NPY receptors will result in an increased pelvic nerve and VIP-mediated increases in vaginal blood flow ie take the break off vasorelaxation. Clinically this will lead to increased vaginal engorgement which will ultimately lead to increased lubrication *via* plasma transudation and increased vaginal compliance. Hence, a suitable target for the treatment of FSAD is NPY or one of its associated receptors.

Thus, in one preferred aspect, the agent is an NPY $Y_1$ $Y_2$ or $Y_5$ antagonist, preferably an oral NPY $Y_1$ $Y_2$ or $Y_5$ antagonist. This agent will treat FSAD by increasing vaginal blood flow and increasing lubrication.

The NPY-mediated antagonism of VIP-induced increases in blood flow therefore represents a potential therapeutic target by which blood flow in the female genital tract can be influenced. The mechanism through which this antagonism occurs is most likely through NPY $Y_1$ receptor-induced $G_{i/o}$ activation. In other physiological systems NPY $Y_1$ receptors have been implicated in mediating vasoconstriction and inhibiting sympathetic transmitter release (Lundberg *et al.*, 1996; a NPY $Y_2$ effect can not be excluded). We believe in the female genital tract that NPY inhibits vasorelaxation via direct inhibition of adenylate cyclase direct inhibiting VIP release or sympathetic neurotransmission.

As indicated, a $P_{cAMP}$ target is one of the NPY receptors.

The neuronal release of NPY regulates the VIP-induced vasorelaxation of the vaginal vascular bed. This most likely occurs *via* a presynaptic mechanism involving NPY $Y_1$ receptors, although a post-synaptic mode of action can not be excluded. An NPY antagonist will potentiate VIP-induced vasodilation of the vaginal vascular beds.

Clinically this will lead to increased vaginal lubrication and compliance *via* vaginal wall engorgement.

NPY receptor expression studies performed by us have identified NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes within the human vagina.

Hence, in one aspect, the $P_{cAMP}$ target is one or more of the NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes.

Background teachings on NPY and it associated receptors have been prepared by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning NPY has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY) is an abundant and widespread peptide in the mammalian nervous system. It shows sequence homology to peptide YY and over 50% homology in amino acid and nucleotide sequence to pancreatic polypeptide (PNP; 167780). NPY is a 36-amino acid peptide. Minth et al. (1984) cloned the NPY gene starting from mRNA of a pheochromocytoma. Takeuchi et al. (1985, 1986) isolated cDNA clones of the NPY and PNP genes from a pheochromocytoma and a pancreatic endocrine tumor, respectively. Using these cDNA probes to analyze genomic DNA from chromosome assignment panels of human-mouse somatic cell hybrids, they then examined the question of whether the genes are syntenic. The studies showed nonsynteny, with NPY on 7pter-7q22 and PNP on 17p11.1-17qter. By studies of a backcross with Mus spretus, Bahary et al. (1991) mapped the homologous NPY gene to mouse chromosome 6. Since mouse chromosome 6 has homology to human 7q, it is likely that the NPY gene in man is located in the region 7cen-q22. Meisler et al. (1987) excluded close linkage between the loci for cystic fibrosis (219700) and neuropeptide Y. Terenghi et al. (1987) determined the distribution of mRNA encoding NPY in neurons of the cerebral cortex in surgical biopsy specimens and postmortem brain by means of in situ hybridization techniques. They showed consistent localization of NPY gene transcription and expression in normal mature cortical neurons. Baker et al. (1995) showed by fluorescence in situ hybridization that the NPY gene is located on 7p15.1 and exists in single copy. They commented that NPY is one of the most highly conserved peptides known, with, for example, only 3 amino acid differences between human and shark. Neuropeptide Y is a neuromodulator implicated in the control of energy balance and is overproduced in the hypothalamus of ob/ob mice. To determine the role of NPY in the response to leptin (164160) deficiency, Erickson et al. (1996) generated ob/ob mice deficient in NPY. In the absence of NPY, ob/ob mice were less obese because of reduced food

intake and increased energy expenditure, and were less severely affected by diabetes, sterility, and somatotropic defects. These results were interpreted as indicating that NPY is a central effector of leptin deficiency. Genetic linkage analysis of rats that were selectively bred for alcohol preference identified a chromosomal region that included the NPY gene (Carr et al., 1998). Alcohol-preferring rats had lower levels of NPY in several brain regions compared with alcohol-nonpreferring rats. Thiele et al. (1998) therefore studied alcohol consumption by mice that completely lacked NPY as a result of targeted gene disruption (Erickson et al., 1996). They found that NPY-deficient mice showed increased consumption, compared with wildtype mice, of solutions containing 6%, 10%, and 20% (by volume) ethanol. NPY-deficient mice were also less sensitive to the sedative/hypnotic effects of ethanol, as shown by more rapid recovery from ethanol-induced sleep, even though plasma ethanol concentrations did not differ significantly from those of controls. In contrast, transgenic mice that overexpressed a labeled NPY gene in neurons that usually express it had a lower preference for ethanol and were more sensitive to the sedative/hypnotic effects of ethanol than controls. These data provided direct evidence that alcohol consumption and resistance are inversely related to NPY levels in the brain. As part of an on-going study of the genetic basis of obesity, Karvonen et al. (1998) identified a 1128T-C polymorphism that resulted in substitution of leucine by proline at residue 7 in the signal peptide part of pre-pro-NPY. This polymorphism was not associated with obesity or energy metabolism, but was significantly and consistently associated with high serum total and LDL cholesterol levels both in normal-weight and obese Finns and in obese Dutch subjects. Uusitupa et al. (1998) found the pro7 polymorphism in 14% of Finns but in only 6% of Dutchmen. Subjects with pro7 in NPY had, on average, 0.6 to 1.4 mmol/L higher serum total cholesterol levels than those without this gene variant. As the impact of pro7 NPY on serum cholesterol levels could not be found in normal-weight Dutchmen, it can be assumed that obese persons may be more susceptible to the effect of the gene variant. It was calculated that the probability of having the pro7 in NPY could be as high as 50 to 60% in obese subjects with a total serum cholesterol equal to or higher than 8 mmol/L. At least among Finns, the pro7 form of NPY is one of the strongest genetic factors affecting serum cholesterol levels. SEE ALSO Allen and Bloom (1986) ; Dockray (1986) ; Maccarrone and Jarrott (1986) ; Minth et al. (1986)."

As indicated background teachings on NPY and it associated receptors have been prepared by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning NPYR1 has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY; 162640) is one of the most abundant neuropeptides in the mammalian nervous system and exhibits a diverse range of important physiologic activities, including effects on psychomotor activity, food intake, regulation of central endocrine secretion, and potent vasoactive effects on the cardiovascular system. Two major subtypes of NPY (Y1 and Y2) have been defined by pharmacologic criteria. The NPY Y1 receptors have been identified in a variety of tissues, including brain, spleen, small intestine, kidney, testis, placenta, and aortic smooth muscle. The Y2 receptor is found mainly in the central nervous system. Herzog et al. (1992) reported cloning of a cDNA encoding a human NPY receptor which they confirmed to be a member of the G protein-coupled receptor superfamily. When expressed in Chinese hamster ovary (CHO) or human embryonic kidney cells, the receptor exhibited characteristic ligand specificity. In the kidney cell line, the receptor was coupled to a pertussis toxin-sensitive G protein that mediated the inhibition of cyclic AMP accumulation. In the CHO cell line, on the other hand, the receptor was coupled not to inhibition of adenylate cyclase but rather to the elevation of intracellular calcium. Thus the second messenger coupling of the NPY receptor was cell type specific, depending on the specific repertoire of G proteins and effector systems present in the cell type. Larhammar et al. (1992) independently cloned and characterized the neuropeptide Y receptor. Herzog et al. (1993) determined the molecular organization and regulation of the human NPY Y1 receptor gene. In contrast to the contiguous structure of most G protein-coupled receptor genes, they found that the NPY Y1 receptor gene has 3 exons. They also identified a common PstI polymorphism in the first intron of the gene. By high resolution fluorescence in situ hybridization, they localized the gene to 4q31.3-q32. Herzog et al. (1997) found that the NPY1R and NPY5R (602001) genes are colocalized on chromosome 4q31-q32. The 2 genes are transcribed in opposite directions from a common promoter region. One of the alternately spliced 5-prime exons of the Y1 receptor gene is a part of the coding sequence of the Y5 receptor. This unusual arrangement suggested to Herzog et al. (1997) that the 2 genes arose by a gene duplication event and that they may be coordinately expressed. By interspecific backcross analysis, Lutz et al. (1997) mapped the Npy1r and Npy2r genes to conserved linkage groups on mouse chromosomes 8 and 3, respectively, which correspond to the distal region of human chromosome 4q."

As indicated background teachings on NPY and it associated receptors has been prepared by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning NPYR2 has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY) signals through a family of G protein-coupled receptors present in the brain and sympathetic neurons. At least 3 types of neuropeptide Y receptor have been defined on the basis of pharmacologic criteria, tissue distribution, and structure of the encoding gene; see 162641 and 162643. Rose et al. (1995) reported the expression cloning in COS cells of a cDNA for the human type 2 receptor, NPY2R. Transfected cells showed high affinity for NPY (162640), peptide YY (PYY; 600781), and a fragment of NPY including amino acids 13 to 36. The predicted 381-amino acid protein has 7 transmembrane domains characteristic of G protein-coupled receptors and is only 31% identical to the human Y1 receptor (NPY1R; 162641). A 4-kb mRNA was detected on Northern blots of tissue samples from several regions of the nervous system. Gerald et al. (1995) cloned the cDNA corresponding to the human Y2 receptor from a human hippocampal cDNA expression library using a radiolabeled PYY-binding assay. They expressed the Y2 gene in COS-7 cells and performed a hormone-binding assay which showed that the Y2 receptor binds (from highest to lowest affinity) PYY, NPY, and pancreatic polypeptide (PP; 167780) hormones. Ammar et al. (1996) cloned and characterized the human gene encoding the type 2 NPY receptor. The transcript spans 9 kb of genomic sequence and is encoded in 2 exons. As in the type 1 NPY receptor gene, the 5-prime untranslated region of NPY2R is interrupted by a 4.5-kb intervening sequence. Ammar et al. (1996) demonstrated by Southern analysis of rodent-human cell hybrids followed by fluorescence in situ hybridization (FISH) that the NPY2R gene maps to 4q31, the same region containing the NPY1R gene, suggesting that these subtypes may have arisen by gene duplication despite their structural differences. By interspecific backcross analysis, Lutz et al. (1997) mapped the Npy1r and Npy2r genes to conserved linkage groups on mouse chromosomes 8 and 3, respectively, which correspond to the distal region of human chromosome 4q."

An assay for determining whether a putative or actual agent according to the present invention can bind to NPY is presented in WO-A-98/52890 (see page 96 thereof, lines 2 to 28).

I:NPY

As indicated above, the agent may be any suitable agent that can act as an I:NPY (sometimes referred to as an NPY antagonist).

I:NPYs (in particular NPY antagonists) are discussed in the following review articles:

Dunlop J, Rosenzweig-Lipson S : Therapeutic approaches to obestity Exp Opin Ther Pat 1999 8 12 1683 -1694
Wang S, Ferguson KC, Burris TP, Dhurandhar NV: 8th annual international conference on obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus: novel drug developments. Exp Opin Invest Drugs 1999 8 7 1117 -1125
Ling AL : Neuropeptide Y receptor antagonists Exp Opin Ther Pat 1999 9 4 375-384
Adham N, Tamm J, Du P, Hou C, et al : Identification of residues involved in the binding of the antagonist SNAP 6608 to the Y5 receptor Soc Neurosci Abstr 1998 24 part 2 626.9
Shu YZ, Cutrone JQ, Klohr SE, Huang S : BMS-192548, a tetracyclic binding inhibitor of neuropeptide Y receptors, from Aspergillus niger WB2346. II. Physico-chemical properties and structural characterization J Antibiot 1995 48 10 1060-1065
Rigollier P, Rueger H, Whitebread S, Yamaguchi Y, Chiesi M, Schilling W, Criscione L : Synthesis and SAR of CGP 71683A, a potent and selective antagonist of the neuropeptide Y Y5 receptor. Int Symp Med Chem 1998 15th Edinburgh 239
Criscione L, Rigollier P, Batzl-Hartmann C, Rueger H, Stricker-Krongrad A, et al : Food intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. J Clin Invest 1998 102 12 2136 -2145
Neurogen Corp : NGD 95-1 Clin Trials Monitor 1996 5 10 Ab 19244
Buttle LA : Anti-obesity drugs: on target for huge market sales. Exp Opin Invest Drugs 1996 5 12 1583 -1587
Gehlert DR, Hipskind PA : Neuropeptide Y receptor antagonists in obesity. Exp Opin Invest Drugs 1996 7 9 1827 -1838
Goldstein DJ, Trautmann ME : Treatments for obesity. Emerging Drugs 1997 2 – 1-27
Hipskind P A, Lobb K L, Nixon J A, Britton T C, Bruns R F, Catlow J, Dieckman McGinty D K, Gackenheimer S L, Gitter B D, Iyengar S, Schober D A, et al. : Potent and selective 1,2,3-trisubstituted indole NPY Y-1 antagonists. J Med Chem 1997 40 3712 –3714

Zimmerman DM, Cantrall BE, Smith ECR, Nixon JA, Bruns RF, Gitter B, Hipskind PA, Ornstein PL, Zarrinmayeh H, Britton TC, Schober DA, Gehlert DR: Structure-activity relationships of a series of 1-substituted-4-methylbenzimidazole neuropeptide Y-1 receptor antagonists Bioorganic Med Chem Lett 1998 8 5 473 –476

Zarrinmayeh H, Nunes A, Ornstein P, Zimmerman D, Arnold MB, et al : Synthesis and evaluation of a series of novel 2-[(4-chlorophenoxy)methy]benzimidazoles as selectiveneuropeptide Y Y1 receptor antagonists J Med Chem 1998 41 15 2709 – 2719

Britton TC, Spinazze PG, Hipskind PA, Zimmerman DM, Zarrinmayeh H, Schober DA, Gehlert DR, Bruns RF : Structure-activity relationships of a series of benzothiophene-dervied NPY-Y1 antagonists: optimization of the C2 side chain Bioorganic Med Chem Lett 1999 9 3 475 -480

Zarrinmayeh H, Zimmerman DM, Cantrell BE, Schober DA, Bruns RF, Gackenheimer SL, Ornstein PL, Hipskind PA, Britton TC, Gehlert DR : Structure-activity relationship of a series of diaminoalkyl substituted benzimidazole as neuropeptide Y Y1 receptor antagonists Bioorganic Med Chem Lett 1999 9 5 647 -652

Murakami Y, Hara H, Okada T, Hashizume H, Kii M, Ishihara Y, Ishikawa M, Mihara S-I, Kato G, Hanasaki K, Hagishita S, Fujimoto M : 1,3-disubstituted benzazepines as novel, potent, selective neurpeptide Y Y1 receptor antagonists J Med Chem 1999 42 14 2621-2632

Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Beck Sickinger AG, Doods HN : The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur J Pharmacol 1994 271 2-3 R11 -R13

Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Doods HN : Subtype selectivity and antagonbist profile of the nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226 J Pharmacol Exp Ther 1995 275 1 143 –149.

Wright J, Bolton G, Creswell M, Downing D, Georgic L, Heffner T, Hodges J, MacKenzie R, Wise L : 8-amino-6-(arylsulphonyl)-5-nitroquinolones: novel nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonists Bioorganic Med Chem Lett 1996 6 15 1809 -1814

Capurro D, Huidobro-Toro JP : The involvement of neyropeptide Y Y1 receptors in the blood pressure baroreflex:studies with BIBP 3226 and BIB 3304. Eur J Pharmacol 1999 376 3 251 –255

Dumont Y, Cadieux A, Doods H, Quirion R : New tools to investigate neuropeptide Y receptors in the central and peripheral nervous systems: BIBO-3304 (Y1), BIIE-246 (Y2) and [125I]-GR-231118 (Y1/Y4). Soc Neurosci Abstr 1999 25 Part 1 Abs 74.11

Hegde SS, Bonhaus DW, Stanley W, Eglen RM, Moy TM, Loeb M, et al : Pharmacological evaluation of 1229U91, a high affinity and selective neuropeptide Y(NPY) - Y1 receptor antagonist Pharmacol Res 1995 31 190

Matthews JE, Chance WT, Grizzle MK, Heyer D, Daniels AJ : Food intake inhibition and body weight loss in rats treated with GI 264879A, an NPY-Y1 receptor. Soc Neurosci Abstr 1997 23 Pt 2 1346

Doods HN, Willim K-D, Smith SJ : BIBP 3226: a selective and highly potent NPY-Y1 antagonist Proc Br Pharmacol Soc 1994 13-16 Dec. C47

Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Beck Sickinger AG, Doods HN : The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur J Pharmacol 1994 271 2-3 R11 -R13

Serradeil-Le-Gal C, Valette G, Rouby PE, Pellet A, Villanova G, Foulon L, Lespy L, Neliat G, Chambon JP, Maffrand JP, Le-Fur G : SR 120107A and SR 120819A: Two potent and selective, orally-effective antagonists for NPY Y1 receptors Soc Neurosci Abstr 1994 20 Pt 1 907 -Abs 376.14

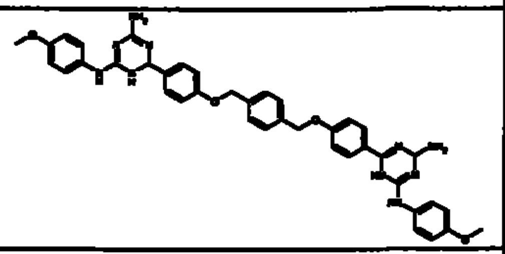
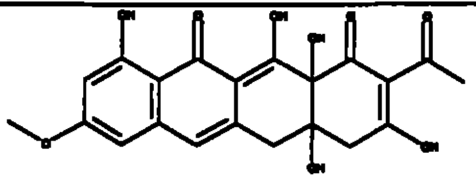
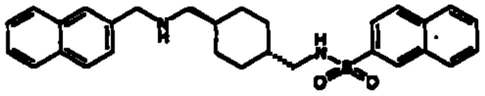
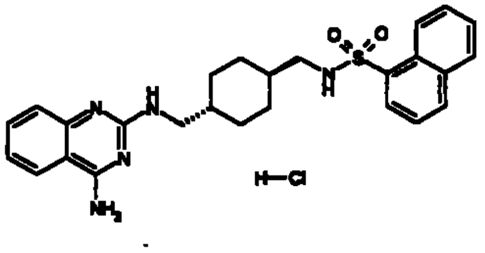
Hong Y, Gregor V, Ling AL, Tompkins EV, Porter J, Chou TS, Paderes G, Peng Z, Hagaman C, Anderes K, Luthin D, May J : Synthesis and biological evaluation of novel guanylurea compounds as potent NPY Y1 receptor antagonist Acs 1999 217 Anaheim MEDI 108

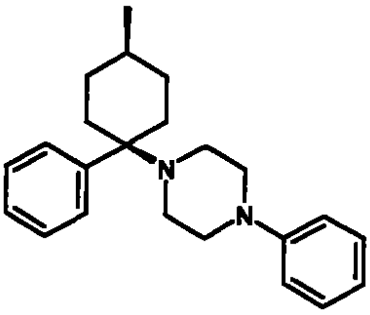
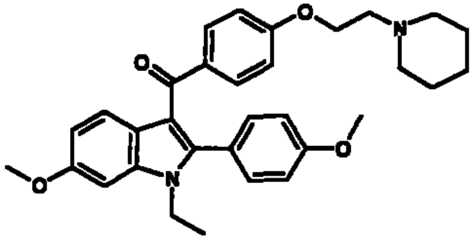
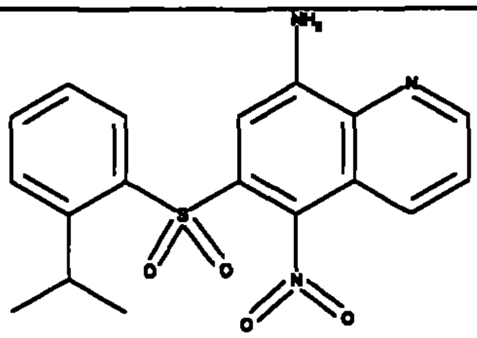
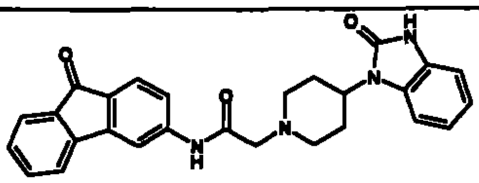
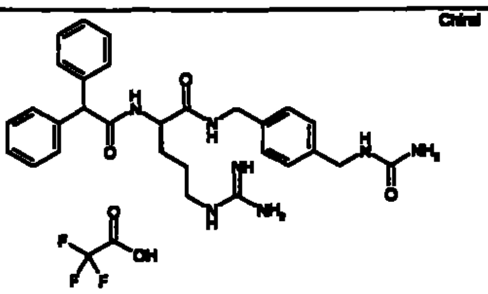
I:NPYs (in particular NPY antagonists) are disclosed in the following documents:

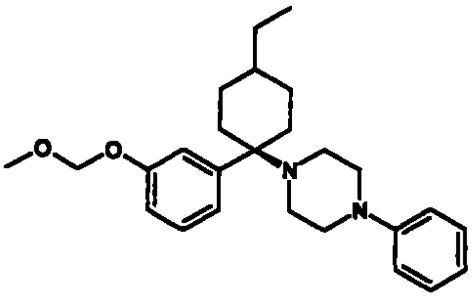
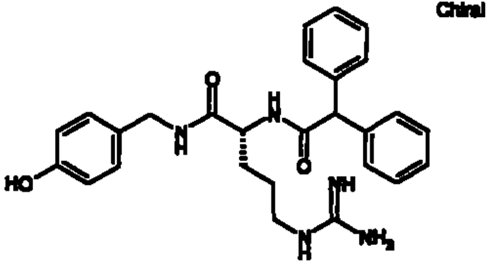
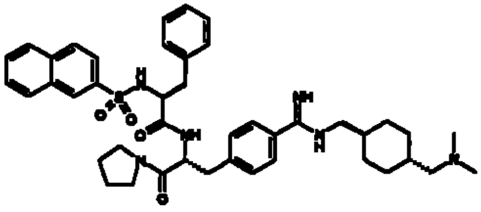
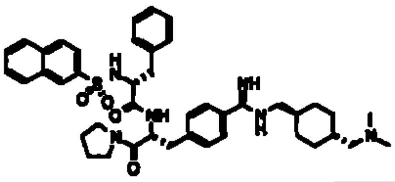
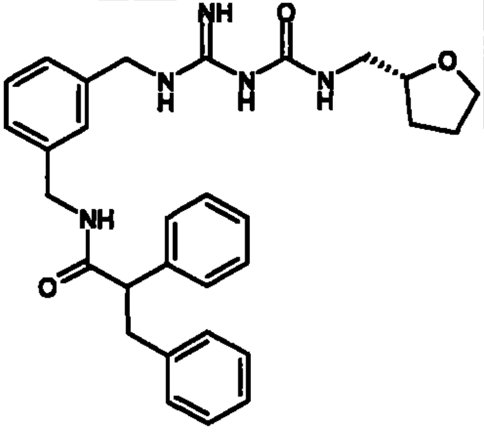
WO-98/07420
WO-94/00486
WO-96/22305
WO-97/20821
WO-97/20822
WO-96/14307
JP-07267988
WO-96/12489
US-5552422
WO-98/35957

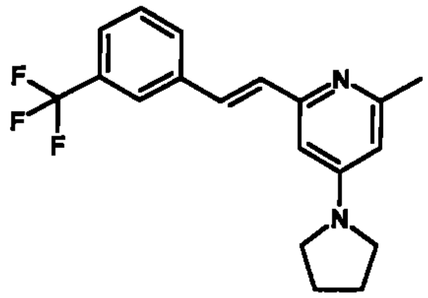
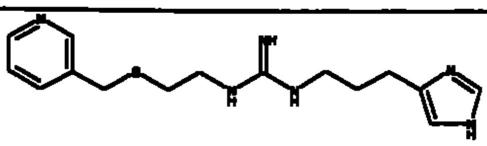
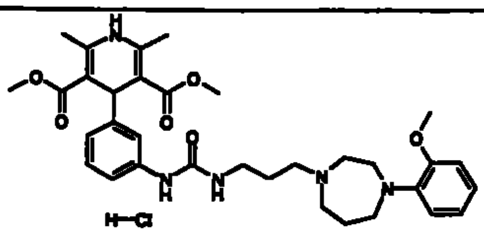
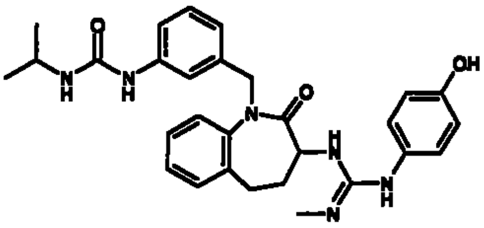
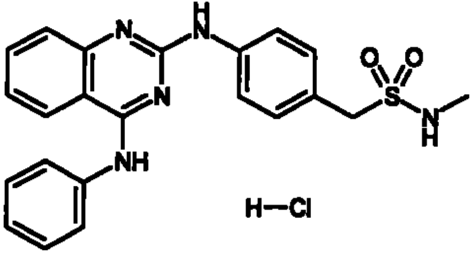
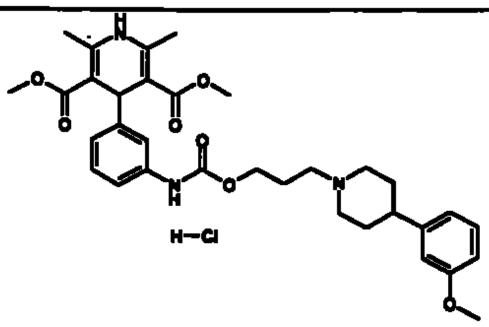
WO-96/14307
WO-94/17035
EP-0614911
WO-98/40356
EP-0448765
EP-0747356
WO-98/35941
WO-97/46250
EP-0747357

Preferred examples of I:NPYs are selected from the following structures:

| **Compound** | **Structure** | **Mode of Action**<br>**References** |
|---|---|---|
| | | |
| F34 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/07420<br>Ref 3 |
| F35 |  | I:NPY<br>Ref 5 |
| F36 |  | I:NPY Y5<br>Ref 1, 4 |
| F37 | Ile - Cys- Pro- Cys- Tyr- Arg- Leu- Arg- Tyr- NH2 cyclic (2,2'), (4,4')- disulfide dimer | I:NPY Y1<br>WO-94/00486<br>WO-96/22305<br>Ref 1,2, 23 |
| F38 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/20821<br>WO-97/20822<br>Ref 1, 3, 6, 7 |

| | | |
|---|---|---|
| F39 |  | I:NYP Y1<br>WO-96/14307<br>Ref 1, 8, 9, 10, 11 |
| F40 | | I:NPY Y1<br>JP-07267988<br>Ref 1 |
| F41 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/12489<br>Ref 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |
| F42 |  | I:NPY Y1<br>US-5552422<br>Ref 17, 18, 19, 20 |
| F43 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/35957<br>Ref 3 |
| F44 |  | I:NPY Y1<br>Ref 21, 22 |

| | | |
|---|---|---|
| F45 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref 3 |
| F46 | ? | I:NPY Y1<br>Ref 24 |
| F47 |  | I:NPY Y1<br>WO-94/17035<br>Ref 3, 17, 25, 26 |
| F47 | | I:NPY Y1<br>Ref 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |
| F48 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27 |
| F49 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27 |
| F50 |  | I:NPY Y1<br>Ref 28 |

| | | |
|---|---|---|
| F51 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/40356 |
| F52 |  | I:NPY<br>EP-0448765 |
| F53 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747356 |
| F54 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/35941 |
| F55 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/46250 |
| F56 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747357 |

VIP (vasoactive intestinal peptide)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is VIP or one of its associated receptors. Current classification/nomenclature refers to these as VPAC1, VPAC2 and PACAP).

Nucleotide sequences and amino acid sequences for VIP and its receptors are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

We have shown that VPAC1and VPAC2 are present in human and rabbit vagina. PACAP was absent from both rabbit and human vagina.

VIP is the major endogenous neurotransmitter released during sexual arousal that is responsible for nerve-induced vaginal vasodilation of the vascular beds located in the vaginal wall. These vasodilatory effects are mediated by adenylate cyclase activation and cAMP production. Without wishing to be bound by theory, this effect may be mediated via VIP receptor subtypes $VPAC_1$, $VPAC_2$ or PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) receptors. $VPAC_2$ and PACAP receptors are not expressed outside of the CNS and the receptors despite being expressed in the pituitary, appears to have no widespread biological function.

The agent of the present invention could potentiate VIP and/or act as a VIP mimetic. The agent would then potentiate and/or mimic the vasorelaxant effects of endogenous VIP released during sexual arousal. The agent may also have an additive effect on VIP-induced relaxations of vaginal smooth muscle. Clinically this will lead to FSAD treatment, though increased vaginal lubrication *via* vaginal wall engorgement and compliance.

A suitable agent may be a VIP analogue.

Background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning VIP has been extracted from that source.

"Vasoactive intestinal peptide (VIP), a 28-amino acid peptide originally isolated from porcine duodenum, is present not only in gastrointestinal tissues but also in neural tissues, possibly as a neurotransmitter, and exhibits a wide variety of biological actions. Because VIP shows similarities to glucagon, secretin and gastric inhibitory peptide (GIP), it has been considered a member of the glucagon-secretin family. The primary translation product of the mRNA encoding VIP (prepro-VIP) has a molecular weight of 20 daltons. By cloning the DNA sequence complementary to the mRNA coding for human VIP, Itoh et al. (1983) found that the VIP precursor contains not only VIP but also a novel peptide of 27 amino acids, designated PHM27, that has aminoterminal histidine and carboxyterminal methionine. It differs from PHI17 isolated from porcine intestine by 2 amino acids; PHI27, as its designation indicates, has carboxyterminal isoleucine. Linder et al. (1987) isolated the human gene for VIP and PHM27 and studied its expression in various tissues of the rat. Heinz-Erian et al. (1985) suggested that deficient innovation of sweat glands of cystic fibrosis patients by the VIP neuropeptide might be a basic mechanism for the decreased water content and relative impermeability of the epithelium to chloride and other ions that characterize cystic fibrosis. To test this hypothesis, Gozes et al. (1987) took the 'candidate gene' approach. Bodner et al. (1985) had shown that VIP and PHM-27 are encoded by adjacent exons. Gozes et al. (1987) used the PHM-27-encoding genomic fragment to detect the presence of the VIP gene at 6q21-qter. Thus, they eliminated a defective VIP gene as a candidate for the primary cause of cystic fibrosis (which is coded by chromosome 7). By in situ hybridization techniques, Gozes et al. (1987) assigned the VIP gene to 6q24. This placed VIP in the region of MYB (189990), which has been mapped to 6q22. Gozes et al. (1987) investigated a functional relationship between the 2 genes in neuronal tissue. They observed a sharp peak of MYB mRNA in the hippocampus of 3-day-old rats, preceding the peak of VIP mRNA that occurs in this area at 8 days of age. Omary and Kagnoff (1987) found nuclear receptors for VIP in a human colonic adenocarcinoma cell line. Gotoh et al. (1988) assigned VIP to chromosome 6 by spot blot hybridization of a molecularly cloned fragment of the gene to sorted chromosomes. The localization was refined to 6q26-q27 by in situ hybridization."

As indicated, background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning VIPR1 or VPAC1 has been extracted from that source.

"Vasoactive intestinal peptide (VIP; 192320) is an octacosameric neuroendocrine mediator found predominantly in cholinergic presynaptic neurons of the central nervous system and in peripheral peptidergic neurons innervating diverse tissues. Of the many neuroendocrine peptides with immunologic functions, VIP is distinguished by its capacity to affect both B and T cells directly. Distinct subsets of neural, respiratory, gastrointestinal, and immune cells bear specific high-affinity receptors for VIP, which are associated with a guanine nucleotide-binding (G) protein capable of activating adenylate cyclase. Libert et al. (1991) obtained 4 new receptors of the G protein-coupled receptor family by selective amplification and cloning from thyroid cDNA. One of these, termed RDC1, was identified as the VIP receptor by Sreedharan et al. (1991). Libert et al. (1991) mapped the VIPR gene to 2q37 by in situ hybridization. Later information made it doubtful that the gene mapped to 2q37 was in fact the VIP receptor gene (Vassart, 1992). The sequence that was designated GPRN1 by Sreedharan et al. (1991) and mapped to 2q37 was found not to bind VIP by Wenger (1993). Sreedharan et al. (1995) isolated an authentic type I VIP receptor gene and by fluorescence in situ hybridization localized it to the 3p22 band in a region associated with small-cell lung cancer. By interspecific backcross analysis, Hashimoto et al. (1999) mapped the mouse Vipr1 gene to the distal region of chromosome 9, a region that shows homology of synteny with human chromosome 3p. Sreedharan et al. (1993) cloned a human intestinal VIP receptor gene; the deduced amino acid sequence shares 84% identity with the rat lung VIP receptor. Couvineau et al. (1994) isolated 2 VIPR cDNA clones from a human jejunal epithelial cell cDNA library. One encodes a VIP receptor consisting of 460 amino acids and having 7 putative transmembrane domains, as do other G protein-coupled receptors. The other encodes a 495-amino acid VIP receptor-related protein exhibiting 100% homology with the functional VIP receptor over the 428 amino acids at the C-terminal region, but containing a completely divergent 67-amino acid N-terminal domain. When expressed in COS-7 cells, the second protein did not bind radioiodinated VIP, although it was normally addressed at the plasma membrane as assessed by immunofluorescence studies. The type I VIP receptor, also termed type II PACAP receptor (see 102981 for another type of PACAP receptor), was found by Sreedharan et al. (1995) to span approximately 22 kb and to be comprised of 13 exons (ranging from 42 to 1,400 bp) and 12 introns (ranging from 0.3 to 6.1 kb). Sreedharan et al. (1995) also characterized the promoter and the 5-prime flanking region of the gene."

As indicated, background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning VIPR2 or VPAC2 has been extracted from that source.

> "Vasoactive intestinal peptide (VIP; 192320) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP; 102980) are homologous peptides that function as neurotransmitters and neuroendocrine hormones. While the receptors for VIP and PACAP share homology, they differ in their substrate specificities and expression patterns. See VIPR1 (192321) and ADCYAP1R1(102981). Svoboda et al. (1994) performed low stringency PCR using primers based on sequences conserved among VIP receptors. They cloned the human VIP2 receptor gene from a lymphoblast cDNA library. This gene encoded a 438-amino acid polypeptide that shares 86% identity with the rat VIP2 receptor. They expressed the human VIP2 receptor in Chinese hamster ovary cells and found that it binds to PACAP-38, PACAP-27, VIP, and helodermin, and that binding of the receptor to any of these peptides activates adenylate cyclase. Peptide binding was found to be inhibited by GTP. Adamou et al. (1995) cloned the VIP2 receptor gene from a human placenta cDNA library. Northern blotting revealed that VIPR2 is expressed as 2 transcripts of 4.6 kb and 2.3 kb at high levels in skeletal muscle and at lower levels in heart, brain, placenta, and pancreas. Mackay et al. (1996) used fluorescence in situ hybridization to map the VIPR2 gene to human chromosome 7q36.3. Further mapping with cell lines derived from patients with holoprosencephaly type 3 (HPE3; 142945) revealed that the VIPR2 gene lies within the HPE3 minimal critical region. Mackay et al. (1996) stated that although VIPR2 may contribute to the HPE3 phenotype, it is not the sole factor responsible."

## AC (adenylate cyclase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is AC.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for AC are available in the literature.

To confirm that VIP induces vasorelaxation via elevation of intracellular cAMP levels and consequent activation of adenylate cyclase we have measured vaginal cAMP concentrations during VIP stimulation and used forskolin, an adenylate cyclase activator, to mimic the effects of activating the cAMP/adenylate cyclase pathway.

In these studies, we found that VIP treatment and forskolin treatment elevate intracellular concentrations cAMP in isolated vaginal tissue.

We also found that forskolin increases vaginal blood flow in an animal model of sexual arousal.

Additionally we found that forskolin induces relaxation in isolated vagina.

Background teachings on AC are presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning AC has been extracted from that source.

> "Adenylyl cyclase (EC 4.6.1.1 ) catalyzes the transformation of ATP into cyclic AMP. The enzymatic activity is under the control of several hormones, and different polypeptides participate in the transduction of the signal from the receptor to the catalytic moiety. Stimulatory or inhibitory receptors (Rs and Ri) interact with G proteins (Gs and Gi) that exhibit GTPase activity and they modulate the activity of the catalytic subunit of the adenylyl cyclase. Parma et al. (1991) cloned a cDNA corresponding to human brain adenylyl cyclase, symbolized by them as HBAC1. By in situ hybridization to metaphase chromosomal spreads using the human brain cDNA probe, Stengel et al. (1992) showed that the gene is located on 8q24.2. A highly homologous gene, ADCY2 (103071), was assigned to 5p15.3 by the same method."

GENERAL RECOMBINANT DNA METHODOLOGY TECHNIQUES

Although in general the techniques mentioned herein are well known in the art, reference may be made in particular to Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) and Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. PCR is described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188.

SUMMARY

In summation, the present invention relates to:

1. A pharmaceutical composition for subsequent use in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

2. The use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD.

3. A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

4. An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In other embodiments, the present invention relates to:

5. A pharmaceutical composition for subsequent use in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; wherein the agent is selected from any one or more of:

a cAMP mimetic
I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$

I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

6. The use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is selected from any one or more of:

a cAMP mimetic
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

7. A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD, wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient, wherein the agent is selected from any one or more of:
a cAMP mimetic
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$

I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

8. An assay method for identifying an agent that treat a female suffering from FSD, in particular FSAD, the assay method comprising determining whether or not a putative agent is capable of acting as any one or more of:

a cAMP mimetic
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$

wherein if the putative agent is capable of acting as any one or more of

a cAMP mimetic
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP

U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$

then the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In other embodiments, the present invention relates to:

9. A pharmaceutical composition for subsequent use in enhancing vaginal blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

10. The use of an agent in the manufacture of a medicament for enhancing vaginal blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female.

11. A method of treating female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the female so as to cause enhanced vaginal blood flow.

## EXAMPLES

The present invention will now be described, by way of example only, in which reference is made to the following Figures:

Figure 1 which is a graph;
Figure 2 which is a graph;
Figure 3 which is a graph;
Figure 4 which is a graph;
Figure 5 which is a graph;
Figure 6 which is a graph;
Figure 7 which is a graph; and
Figure 8 which is a graph.

In more detail:

Figure 1:- Electrical stimulation of the pelvic nerve induces a frequency-dependent increase in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Increasing the stimulation frequency induces larger increases in blood flow. Changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 2:- Vasoactive intestinal peptide (VIP)-induces increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Figure 2a illustrates how vaginal blood flow is increased in a concentration dependent manner by infusions of VIP (intravenous bolus). Figure 2b demonstrates that 2 repetitive infusions of VIP produce similar increases in blood flow. Note the duration of the response is also similar. All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 3:- Vasoactive intestinal peptide (VIP) reduces the mean arterial blood pressure in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. This graph illustrates the *typical* effects of the vasoactive agents and stimulation parameters used to investigate vagina blood flow on mean arterial pressure in an anaesthetised rabbit. These observed effects are typical of the trends seen in all animals tested. VIP induced a significant depression of mean arterial pressure whereas pelvic nerve stimulation, control infusions of Hepsaline or inhibitors of $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ or NEP have no effect on blood pressure. Note, the reduction in blood pressure associated with VIP infusions is also associated with a large increase in heart rate.

Figure 4:- Activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway mimics VIP mediated vasorelaxation and smooth muscle relaxation in vaginal tissue. Figure 4a illustrates that an infusion of forskolin (40nmol/kg *iv* bolus, a cAMPmimetic) induces significant increases in vaginal blood flow. Note the amplitude and duration of the response is similar to that induced by VIP (1.0μg/kg, *iv* bolus). Interestingly, the effects on blood flow have a longer duration of action on the external vaginal wall. All changes were monitored using laser Doppler technologies. Figure 4b demonstrates that both VIP (0.1μM) and forskolin (10μM) significantly elevate intracellular concentrations of cAMP above basal levels in the rabbit vagina. Figure 4c shows that forskolin induces potent relaxations of precontracted (1μM phenylephrine) rabbit vaginal strips with an $IC_{50}$~300nM. All changes were quantified using *in vivo* laser Doppler technologies, biochemical cAMP enzyme immunoassay or by *in vitro* tissue relaxation.

Figure 5:- A selective inhibitor of NEP EC 3.4.24.11 enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive PNS at 15 minute intervals induces reproducible increases in vaginal blood flow (White bar). Administration of a NEP inhibitor (Black bar) enhanced the peak increase in vaginal blood flow induced by submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz) compared to increases observed during time matched control stimulations (Grey bar). The following dose dependant enhancements were observed - 0.1mg/kg iv induced a 35.0±7.6% increase; 0.3mg/kg iv induced a 42.6±27.7% increase and 1.0mg/kg iv induced a 52.8±32.5% increase (mean±sem n=3). The NEP inhibitor had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow. All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 6:- Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive infusions of VIP at 30 minute intervals induce reproducible increases in vaginal blood flow (See figure 2b). An NEP inhibitor both potentiates the amplitude and prolongs the duration of enhanced blood flow when these increases are induced by submaximal doses of VIP e.g. 0.3μg/kg. At doses of VIP which induce maximal increases in vaginal blood flow eg 3μg/kg, NEP inhibitors only potentiate the duration of enhanced vaginal blood flow. VIP-induced increase in the presence of a NEP inhibitor are shown as closed triangles whereas control VIP responses are shown as

open triangles. A control infusion of Hepsaline has no effect on the amplitude of the responses. All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 7:- A selective inhibitor of PDE$_{cAMP}$ type 2 enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive PNS at 15 minute intervals induces reproducible increases in vaginal blood flow (White squares). Administration of a PDE$_{cAMP}$ type 2 inhibitor enhanced the peak increase in vaginal blood flow induced by submaximal stimulation frequencies (Black squares; at 4Hz) compared to increases observed during time matched control stimulations (Open squares). An infusion of the PDE2 inhibitor (500µg/kg) induced a 86.8±21.9% enhancement in vaginal blood flow (mean±sem n=2). All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 8:- Selective inhibitors of PDE$_{cAMP}$ type 2 enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive infusions of VIP at 30 minute intervals induce reproducible increases in vaginal blood flow (See figure 2b). A selective PDE$_{cAMP}$ type 2 inhibitor (25µg/kg *iv* bolus) potentiates the duration of enhanced vaginal blood flow induced by VIP (3µg/kg *iv* bolus). VIP-induced increases in the presence of a PDE$_{cAMP}$ inhibitor are shown as closed triangles whereas control VIP responses are shown as open triangles. A control infusion of Hepsaline had no effect on the amplitude of the responses. All changes were monitored using Laser Doppler technologies.

## AN ASSAY FOR MEASURING cAMP ACTIVITY/LEVELS

Measurement of cAMP from vaginal tissue samples using a Biotrak cAMP Enzymeimmunoassay (EIA) kit (Amersham Life Sciences RPN 225).

cAMP levels are measured by EIA in vaginal tissue samples. The EIA is based on competition between unlabelled cAMP and a fixed quantity of peroxidase labelled cAMP for a limited amount of cAMP specific antibody.

## 1. MATERIALS

All materials are supplied by Amersham Life Science cAMP EIA kit (RPN 225) unless otherwise stated.

1.1 Microtitre plate - 96 well plate coated with donkey anti-rabbit IgG.

1.2 Assay buffer - 0.05M sodium acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. The contents of the bottle are transferred to a graduated cylinder using 3x15ml distilled water washes. The final volume is then adjusted to 500ml.

1.3 cAMP standard (for acetylation method). cAMP at 10.24pmol/ml in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Standard is dissolved in 2.5ml of assay buffer for use.

1.4 Antiserum. Anti-cAMP antibody in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Prior to use, antibody is diluted with 11ml assay buffer and mixed by gentle inversion to dissolve contents.

1.5 cAMP conjugate. cAMP horseradish peroxidase in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Prior to use, solution is diluted with 11ml assay buffer and mixed by gentle inversion to dissolve contents.

1.6 Wash buffer. 0.01M phosphate buffer pH7.5 containing 0.05% (v/v) Tween™ 20 upon reconstitution. The contents of the bottle are transferred to a graduated cylinder using 3x15ml distilled water washes. The final volume is then adjusted to 500ml.

1.7 TMB substrate. 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine (TMB)/ hydrogen peroxide, in 20% (v/v) dimethylformamide.

Ready for use.

1.8 Acetylation reagent. 2ml acetic anhydride, 4ml triethylamine, prepared as required.

1.9 Sulphuric acid (1M). 1M Sulphuric acid is prepared from an 18M stock (BDH). 1.11ml of acid is added to 18.8ml of distilled water, this provides enough for one plate.

## 2. SPECIFIC EQUIPMENT

2.1 Disposable 5ml glass test tubes
2.2 Spectrophotometric plate reader (Spectra max 190)
2.3 Microtitre plate shaker (Luckham R100)

## 3. METHODS

- Tissue sample preparation. The tissues were treated with the relevant pretreatment in 5ml samples of physiological salt solution eg agonists, cAMPmimetics etc. After treatment the samples were snap frozen in liquid nitrogen and then smashed using a hammer. The powder was scraped into a centrifuge tube and 1ml of 0.5M ice cold perchloric acid (PCA) was added. The sample was vortex mixed and left on ice for 1hr.
- cAMP extraction from tissue samples. The samples were centrifuged at 10000g for 5 min at 4°C. The supernatant was removed and placed in other centrifuge tubes. The pellet was keep for protein analysis at -80°C. The supernatant samples were then neutralised to pH~6 using $K_3PO_4$. Centrifuged at 10000g for 5 min at 4°C. Recover supernatant and wash 4 times with 5 volumes (5ml) of water saturated diethyl ether. The upper ether layer should be discarded after each wash. Transfer aqueous to into a short thin glass tube and dry under a steam of nitrogen at 60°C. Dissolve dried extract in 1ml of assay buffer and store in refrigerator until required (or can be frozen).
- Stock reagents are equilibrated to room temperature and working solutions then prepared
- cAMP standards are prepared in glass tubes labelled 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, and 512fmol. This is achieved by adding 1ml of assay buffer to all tubes except the 512fmol standard. 1ml of acetylation standard (10.24pmol/ml) is then added to the two top standards (256, and 512fmol). The 256fmol standard is vortexed and 1ml transferred to the 128fmol standard. his is continued until the 2fmol standard where 1ml of solution is disposed of. A zero standard tube is set up containing 1ml of assay buffer.
- Tissue extract samples are thawed on ice (if necessary) and diluted 1 in 100 (10µl sample to 990µl assay buffer) in labelled glass tubes.

- The cAMP in all standards and samples is acetylated by the addition of 100µl of acetylation reagent in a fume hood which is added down the side of the tube before immediately vortexing.
- 50µl of all standards and samples are added to the appropriate wells of the 96 well plate, and 150µl of assay buffer is added to non specific binding (NSB) wells.
- 100µl of antiserum is added to all wells except blanks (B) and NSB before incubating for 2 hours at 3-5°C.
- After incubation, 100µl of cAMP-peroxidase conjugate is added to all wells except B before a further 1 hour incubation at 3-5°C.
- Plates are emptied by turning them upside down and blotting onto absorbent paper before washing each well four times with 400µl of wash buffer. After each wash plates are re-blotted to ensure any residual wash buffer is removed. 200µl TMB is then immediately dispensed into all wells.
- Plates are put on a plate shaker for 30 minutes at room temperature before the addition of 100µl of 1M sulphuric acid into all wells. The optical density is read on Spectra max 190 at 450nm within 30 minutes.

## 4. STANDARDS

With each assay the following standard tubes are set up:-

### 4.1 Spiking a standard in assay buffer

A known amount of cAMP is spiked into assay buffer to determine the efficiency of the assay. 70pmol/ml of cAMP is added to assay buffer which is equivalent to 35fmol/well in the assay, which is in the middle of the dose response curve.

To make up 1ml of standard:- 68.4µl 521fmol/well standard
931.6µl Assay buffer

4. Effects of compounds on plate

Standards are set up to determine whether the compound used in the functionalstudies has any effect on the 96 well plate or affects the binding of cAMP. These include:-

- Spiking the compound into assay buffer alone to assess the effects of the compound directly on the plate.
- Spiking the compound into plasma containing basal levels of cAMP to assess the effects of the compound on the binding of cAMP to the plate.

5nM concentrations of compound are spiked into each standard. 5nM is chosen because total drug levels at the end of infusion have in the past been approximately 150-300nM. Samples are diluted 1:100 before being assayed, therefore 5nM allows for any larger than expected total drug concentrations at the end of infusion.

5. CALCULATIONS

The Spectra max plate reader reads the optical density (OD) at 450nm.

The standard curve is generated by plotting the %B/Bo (y axis) against cAMP fmol/well (x axis) on Spectra max.

%B/B0 (% bound) for each sample and standard is calculated as follows:-
Bo = zero standard (see methods 3.2)

$$\%B/Bo = \frac{(\text{standard or sample OD-NSB OD})}{(\text{Bo OD-NSB OD})} \times 100$$

The fmol/well volume can then be read directly from the standard curve for each sample. Values are then converted to pmol/ml before taking the mean of each pair of samples.

Conversion of values from fmol/well to pmol/ml:-

fmol to pmol = divide by 1000
Volume in well = 50µl .... So (x1000)
50
Sample is diluted 1/100, so overall = 1 x 1000/1000 x 100/50 = 2

So all fmol/well values are multiplied by 2 to give pmol/ml

## ANIMAL TEST MODEL

## POTENTIATING THE EFFECTS OF CYCLIC ADENOSINE-3',5'-MONOPHOSPHATE (cAMP) RESULTS IN INCREASES IN VAGINAL BLOOD FLOW IN THE ANAESTHETISED RABBIT MODEL OF SEXUAL AROUSAL

### 1.0 Aims

1. To develop and validate an animal model of female sexual arousal.
2. To identify the mechanism(s) responsible for the regulation of vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit.
3. To identify potential approaches for enhancement of vaginal blood flow.
4. To investigate the mechanism(s) that underlie relaxation of vaginal smooth muscle and to identify potential approaches for enhancement of vaginal relaxation.

### 2.0 Introduction

The *normal* sexual arousal response consists of a number of physiological responses that are observed during sexual excitement. These changes such as vaginal, labial and clitoral engorgement result from increases in genital blood flow. Engorgement leads to increased vaginal lubrication via plasma transudation; increased vaginal compliance (relaxation of vaginal smooth muscle) and increases in vaginal and clitoral sensitivity.

Female sexual arousal disorder (FSAD) is a highly prevalent sexual disorder affecting up to 40% of pre-, peri- and postmenopausal (±HRT) women. The primary consequence of FSAD is reduced vaginal engorgement or swelling which manifests itself as a lack of lubrication and a lack of pleasurable genital sensation. Secondary consequences include reduced sexual desire, pain during intercourse and difficulty in achieving orgasm. The most common cause of FSAD is decreased genital blood flow resulting in reduced vaginal, labial and clitoral engorgement. (Park, 1997; Goldstein, 1998; Berman, 1999a, Werbin, 1999).

As explained herein, the present invention provides a means for restoring or mimicing the normal sexual arousal response in women suffering from FSAD, by enhancing genital blood flow.

In our studies, we have identified cAMP (cyclic adenosine-3',5'-monophosphate) as the mediator of vaginal vasorelaxation using laser Doppler technology to measure small changes in genital blood flow. This has involved developing an animal model of sexual arousal and then demonstrating that the data mimics the physiological changes observed during female sexual arousal. The model was then used to identify and validate mechanisms that enhance genital blood flow eg. direct or indirect potentiation of cAMP-mediated vasorelaxation.

## 3.0 Methods

### *3.1 Anaesthetic Protocol*

Female New Zealand rabbits (~2.5kg) were pre-medicated with a combination of Medetomidine (Domitor®) 0.5ml/kg *i.m.*, and Ketamine (Vetalar®) 0.25ml/kg *i.m.* whilst maintaining oxygen intake via a face mask. The rabbits were tracheotomised using a Portex™ uncuffed endotracheal tube 3 ID., connected to ventilator and maintained a ventilation rate of 30-40 breaths per minute, with an approximate tidal volume of 18-20 ml, and a maximum airway pressure of 10 cm $H_2O$. Anaesthesia was then switched to Isoflurane and ventilation continued with $O_2$ at 2l/min. The right marginal ear vein was cannulated using a 23G or 24G catheter, and Lactated Ringer perfused at 0.5ml/min. The rabbit was maintained at 3% Isoflurane during invasive surgery, dropping to 2% for maintenance anaesthesia.

### 3.2 *Cannulation of Vessels*

The left groin area of the rabbit was shaved and a vertical incision was made approximately 5cm in length along the thigh. The femoral vein and artery were exposed, isolated and then cannulated with a PVC catheter (17G) for the infusion of drugs and compounds. Cannulation was repeated for the femoral artery, inserting the catheter to a depth of 10cm to ensure that the catheter reached the abdominal aorta. This arterial catheter was linked to a Gould system to record blood pressure. Samples for blood gas analysis were also be taken via the arterial catheter. Systolic and diastolic pressures were measured, and the mean arterial pressure calculated using the formula (diastolic x2 + systolic) ÷3. Heart rate was measured via the pulse oxymeter and *Poh-Ne-Mah* data acquisition software system (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems Inc.).

### 3.3 *Stimulation of the Pelvic Nerve*

A ventral midline incision was made into the abdominal cavity. The incision was about 5cm in length just above the pubis. The fat and muscle was *bluntly* dissected away to reveal the hypogastric nerve which runs down the body cavity. It was desirable to keep close to the side curve of the pubis wall in order to avoid damaging the femoral vein and artery which lie above the pubis. The sciatic and pelvic nerves lie deeper and were located after further dissection on the dorsal side of the rabbit. Once the sciatic nerve is identified, the pelvic nerve was easily located. We found that stimulation of the nerve causes an increase in vaginal blood flow, and innervation of the pelvic region. The pelvic nerve was freed away from surrounding tissue and a *Harvard* bipolar stimulating electrode was placed around the nerve. The nerve was slightly lifted to give some tension, then the electrode was secured in position. Approximately 1ml of light paraffin oil was placed around the nerve and electrode. This acts as a protective lubrication to the nerve and prevents blood contamination of the electrode. The electrode was connected to a *Grass* S88 Stimulator. The pelvic nerve was stimulated using the following parameters:- 20V, pulse width 0.5ms, duration of stimulus 10 seconds and a frequency range of 2 to 16Hz. Reproducible responses were obtained when the nerve was stimulated every 15-20 minutes.

A frequency response curve was determined at the start of each experiment in order to determine the optimum frequency to use as a sub-maximal response, normally 4Hz. The compound(s) to be tested were infused, via the femoral vein, using a *Harvard* 22 infusion pump allowing a continuous 15 minute stimulation cycle.

### *3.4 Positioning of the Laser Doppler Probes*

A ventral midline incision was made, at the caudal end of the pubis, to expose the pubic area. The external vaginal wall was exposed by removing any connective tissue. One laser Doppler flow probe was inserted 3cm into the vagina, so that half the probe shaft is still visible. The position of these probes was then adjusted until a signal was obtained. A second probe was placed just above the surface of a blood vessel on the external vaginal wall. Both probes were clamped in position.

Vaginal blood flow was recorded either as numbers directly from the Flowmeter using *Poh-Ne-Mah* data acquisition software system (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems Inc.) or indirectly from Gould chart recorder trace. Calibration is set at the beginning of the experiment (0-62.5ml/min/100g tissue).

### *3.5 Infusion of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)*

The doses of VIP (Bachem, H-3775) infused were 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 µg/kg *iv.* and were infused in a volume of 0.5 ml of saline. VIP was infused using a Harvard 22 pump, infusing at 500µl/min via a 3-way tap into the femoral vein. After VIP infusion, the catheter was flushed with heparinised saline (Hepsaline) so that no VIP was left in the catheter.

For experiments using VIP infusions, there was a need for an initial sensitising dose (10nM), in order that reproducible responses could be obtained. An initial infusion of Hepsaline (50UI/ml) was infused to act as a negative control.

### *3.6 Infusion of Inhibitors*

NEP (Neutral Endopeptidase EC3.4.24.11) inhibitors, phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors and PDE2 inhibitors were made up in 5% glucose solution (200µl 50% glucose in 1.8ml water for injection). The inhibitors were infused at the same rate as VIP. NEP inhibitors were left for 30 minutes prior to a VIP dose response curve, whilst PDE5 and PDE2 inhibitors were left for 15 minutes.

### *3.7 Measurement of smooth muscle relaxation in isolated rabbit vagina*

3.7 (a). Rabbit vagina *in vitro* preparation:- Female New Zealand white rabbits (2.0 - 3.0 kg) were killed by cervical dislocation. The abdominal cavity was opened and the vagina excised. Tissue strips were mounted longitudinally in Wesley Co. 5ml silanised organ chambers with braided silk sutures (6/0 gauge) at an initial resting tension of 1.5g in Krebs bicarbonate buffer maintained at 37°C and gassed with 95%$O_2$/5%$CO_2$. The upper ligature of each tissue strip was attached to a 10g capacity force-displacement transducer and changes in isometric force were measured and recorded using a DART *in vitro* data capture system. Tissues were allowed to equilibrate for 1.5 hours and were regularly washed with Krebs.

3.7 (b). Vasoactive intestinal peptide-induced relaxation of rabbit vagina:- Each tissue was contracted using 1µM bath concentration of phenylephrine. When the contractile response reached a stable plateau (~15 minutes), VIP was cumulatively added to the organ chamber at log units to produce concentrations from 0.1 - 100nM. The relaxation responses were measured 5 minutes after the addition of each concentration of VIP; maximum relaxation was achieved by this time. Tissues then received either a test agent (eg NEP or PDE inhibitor) or DMSO vehicle (time matched control).

3.7 (c). Analysis of data for VIP relaxation experiments:- For each VIP concentration relaxation-response curve, the relaxation responses induced by VIP were expressed as a percentage of the maximum phenylephrine induced contraction. These values were then plotted against log VIP concentration and sigmoidal curves were fitted. For the purpose of curve fitting the minimum relaxation response was constrained to 0 % and the maximum relaxation response was allowed to free fit. The concentration of VIP required to produce 50 % relaxation of the phenylephrine contraction ($EC_{50\ PE}$) was determined.

3.7 (d). Electrical field stimulated relaxation of rabbit vagina:- Rabbit vaginal strips were prepared as described in Section 3.7 (a). The tissue strips were mounted between two platinum electrodes placed at the top and bottom of the organ chamber approximately 4cm apart. Each tissue was contracted using 1µM bath concentration of phenylephrine. When the contractile response reached a stable plateau (15 minutes), the tissues underwent a pre-treatment electrical field stimulated (EFS) induced relaxation curve. This was performed between 40 - 60 volts using sequential frequencies of 2, 4, 8 and 16 Hz delivered as 10 second trains of 0.5 milli second pulse width. The tissues were allowed to return to base line pre-contractile tension between each frequency (5 minutes) and the size of the relaxation response recorded.

After completion of the pre-treatment EFS response curve, all tissues were washed for 15 minutes, allowing the tissues to return to the baseline tension. Tissues then received either a test agent (eg NEP or PDE inhibitor, nitric oxide synthase [NOS] inhibitor) or DMSO vehicle (time matched control). Tissues were re-contracted with phenylephrine (1µM) 15 minutes after the addition of compound or vehicle and an EFS-induced relaxation response curve determined as described above.

For EFS experiments the Krebs was supplemented with atropine (10µM) and guanethidine (150µM) to abolish any cholinergic or adrenergic neuronal innervations of the vagina.

### *3.8 Measurement of cAMP levels in isolated rabbit vagina*

Measurement of cAMP concentrations were made from vaginal tissue extracts using a Biotrak cAMP Enzyme Immunoassay (EIA) kit (Amersham Life Sciences RPN 225). Isolated vaginal tissue samples were treated with test agents (eg forskolin or VIP). After 5 minutes the samples were snap frozen using liquid nitrogen, homogenised and cAMP was extracted. cAMP levels are measured by EIA. The EIA is based on competition between unlabelled cAMP and a fixed quantity of peroxidase labelled cAMP for a limited amount of cAMP specific antibody.

### 3.8 *Measurement of phosphodiesterase (PDE) activity in isolated rabbit vagina*

Human vaginal wall cytosol extracts were obtained from ABS Inc., Delaware (Age of donors 41 and 60 years old). The PDE isoenzymes were separated by Mono-Q anion exchange chromatography and characterised based upon their substrate selectivity, sensitivity to allosteric modulators and selective inhibitors. Western analysis using specific PDE isoenzyme antibodies was also performed to detect PDE expression in the human vagina.

All data are reported as mean ± s.e.m. Significant changes were identified using Student's t-tests.

## 4.0 Results and Discussion

### 4.1 *Animal model of sexual arousal*

In our studies, we have developed a robust reproducible model of the physiology of sexual arousal. Using this anaesthetised rabbit model, we are capable of measuring small changes in vaginal blood flow using Laser Doppler technology. Stimulation of the pelvic nerve is used to simulate the neuronal effects of sexual arousal.

We found that stimulation of the pelvic nerve induces frequency-dependent increases in vaginal blood flow (See Figure 1). These increases are significant when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall. Stimulation of the pelvic nerve at 2Hz induced a mean maximum blood flow elevation of 10.3±1.8, at 4Hz 20.0±4.6, 8Hz 36.3±4.8 and 16Hz 46.6+4.7 ml/min/100g tissue (n=4); 15-20V, 0.5ms, 10s). These values are of similar amplitude to those previously observed in human studies and animal models of arousal (Berman, 1999a; Park, 1997).

We found that submaximal stimulation of the pelvic nerve results in reproducible increases in vaginal blood flow (eg stimulating 4Hz every 15 minutes gave a mean increase of 8.50±0.10ml/min/100g tissue n=8). This reproducibility is maintained for up to 5 hours. We can use the reproducibility of these responses to investigate a.) the identity of endogenous vasoactive agents/mechanisms which mediate vaginal engorgement, and b.) the influence of drugs which may be efficacious in enhancing vaginal blood flow.

We found that there are no adverse cardiovascular effects associated with pelvic nerve stimulation in the anaesthetised rabbit (See Figure 3).

Vaginal blood flow is increased during sexual arousal (Berman, 1999) via an increased arterial blood supply - the vaginal artery, the vaginal branch of the uterine artery, the internal pudendal artery and the middle branches of the middle rectal artery are all involved in supplying blood to the vagina. The pelvic nerve which originates from S2/S4 spinal regions, innervates the lower vagina and related blood vessels. By stimulating the pelvic nerve we can mimic the blood flow effects observed during sexual arousal i.e. an increase in arterial vaginal blood flow. Interestingly, the increased arterial blood flow is not mirrored by venous drainage allowing the capillary networks to become engorged with blood. Vaginal engorgement leads to vaginal lubrication, via increased plasma transudation and this is one of the first pelvic responses observed during sexual stimulation. The neurotransmitters that are released upon pelvic nerve stimulation or during sexual arousal are currently unidentified. Nerves containing neuropeptides and other neurotransmitter candidates that innervate the vasculature and microvasculature of the vagina have been identified immunohistochemically. These studies indicate that calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NPY), nitric oxide synthase (NOS), substance P and vasoactive intestinal peptide (VIP) are all present in the nerves that innervate the human vagina (Hoyle, 1996).

### *4.2* *Validation of the anaesthetised rabbit model of sexual arousal*

In order to translate blood flow data generated using this model to those observed in a human model of sexual arousal, we directly compared our data with vaginal blood flow and cardiovascular data generated in pre-clinical studies.

We found that VIP infusion has the following effects in rabbit model of sexual arousal:-

- Exogenous VIP (*iv* infusion) induces significant concentration-dependent increases in vaginal blood flow (See Figure 2a). These increases are significantly elevated above basal blood flow values when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall. Vaginal blood flow was significantly increased by 24.7±3.6ml/min/100g tissue with an intravenous administration of VIP (3μg/kg). The blood flow remained elevated above basal for about 11 minutes post-infusion. Lower doses induced smaller increases eg 0.3µg/kg, elevated blood flow by 7.5±1.3ml/min/100g tissue and blood flow was elevated for 7 minutes post-infusion.

- Repetitive infusions of similar doses of VIP (*iv* at 30 minute intervals) induce significant reproducible increases in vaginal blood flow (See Figure 2b).

- VIP (*iv*) significantly increases heart rate and decreases mean arterial blood pressure (See Figure 3). At 0.3µg/kg VIP (*iv*) caused significant reduction in mean arterial blood pressure of 13.2±0.7mm Hg and a significant increase in heart rate of 16±4 beats per minute.

This animal model directly reflects the clinical data ie increased vaginal blood flow, suppressed blood pressure and elevated heart rate. Therefore this model can be used to investigate the mechanism(s) that underlie physiological changes that occur during sexual arousal and additionally to validate novel approaches for the enhancement of vaginal blood flow and hence treatment of FSAD.

### *4.3 VIP-induces changes in vaginal blood flow via stimulation of the cAMP/adenylate cyclase pathway*

Ottesen and co-workers demonstrated that VIP induces increases in vaginal blood flow and lubrication in healthy volunteers. However the mechanism by which VIP exert it's effects are unclear. In the literature, there are plenty of examples of VIP signalling through different second messenger systems including cGMP/guanylate cyclase (Ashur-Fabian, 1999), carbon monoxide/heme oxygenase (Fan, 1998) and cAMP/adenylate cyclase (Schoeffter, 1985; Gu, 1992; Foda, 1995). This is exemplified by a recent report which describes how the relaxant effects of VIP in the uterine artery can be explained by the release of nitric oxide (Jovanovic, 1998). Interestingly there is also evidence for VIP modulating NO/cGMP in male urogenital function (Kim, 1994).

In this study we have shown that VIP induces vasorelaxation via elevation of intracellular cAMP levels. By conducting a series of functional experiments we have measured blood flow and smooth muscle relaxation in addition to biochemically measuring intracellular cAMP concentrations. We have used forskolin, an activator of adenylate cyclase or cAMPmimetic, to mimic the effects of activating the cAMP/adenylate cyclase pathway. VIP and forskolin have identical effects on the physiological arousal effects on vaginal blood flow and relaxation.

VIP (1μg/kg) and forskolin (40nmol/kg) induces significant increases in vaginal blood flow 13.2 and 12.7ml/min/100mg tissue respectively (See figures 2a and 4a). These changes in amplitude induced by VIP and forskolin were not significantly different. These increases are significantly elevated above basal blood flow values when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall.

VIP (0.1μM) and forskolin (10μM) both significantly increased intracellular concentrations cAMP above basal levels in isolated vaginal tissue (See Figure 4b).

VIP (0.1μM) and forskolin (10μM) elevate basal concentrations from 276nM by 156% and 238% respectively. The differences in these percentages reflects the difference in concentrations of VIP and forskolin used eg VIP at a concentration of 0.1μM relaxes precontracted isolated vagina by circa 80% where as 10μM forskolin is sufficient to completely relax isolated tissue.

Additionally we showed that VIP and forskolin induces relaxation in isolated vaginal tissue with $EC_{50}$ values of 18.8±0.6nM and 320±20nM respectively (See Figure 4c).

These data establish that VIP induces vaginal vasorelaxation via the cAMP/adenylate cyclase pathway, hence this model can be used to investigate whether pelvic nerve stimulation, i.e. sexual arousal, leads to the release of VIP/activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway. In addition, approaches to enhance vaginal blood flow during sexual arousal, eg by directly or indirectly enhancing cAMP signalling, can also be investigated.

### *4.4 cAMP is the mediator of vaginal vasorelaxation*

The neurotransmitter and second messenger candidates responsible for increases in vaginal blood flow during sexual arousal are currently unidentified. Todate, workers have focused on the nitric oxide (NO)/cGMP pathway. In accordance with the present invention, we have demonstrated that:- 1.) the cAMP/adenylate cyclase pathway mediates VIP-induced increases in vaginal blood flow; 2.) VIP is the endogenous neurotransmitter released during sexual arousal and 3.) endogenously released VIP induces it's vasorelaxant effects via elevation of cAMP.

Agents useful in the present invention are those that prevent the metabolism of VIP or directly enhance cAMP signalling enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow eg NEP inhibitors or $PDE_{cAMP}$ inhibitors respectively (See next section).

In our studies, we have found that we believe that we can exclude a role for NO in arousal-induced increases in vaginal blood flow. In this respect, we have shown that a potent and selective PDE type 5 inhibitor has no effect on either pelvic nerve stimulated- or VIP-induced increases in vaginal blood flow (-5.3±5.5% change in blood flow at 60μg/kg). Additionally PDE type 5 inhibitor has a minimal effect on VIP- or electrical field stimulated (EFS)- induced-relaxations of isolated vaginal smooth muscle (30% enhancement of VIP-induced relaxations; See table 1).

Table 1:- Enhancement of VIP mediated relaxation of isolated rabbit vagina. This table illustrated the percentage enhancement of the $EC_{50}$ for VIP-induced relaxations of precontracted vaginal smooth muscle (1μM phenylephrine). Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ types 1, 2, 3 and 4 all significantly potentiated VIP-mediated relaxations whereas a selective inhibitor of $PDE_{cGMP}$ type 5 or vehicle control had no effect on VIP-mediated relaxations.

| PDE inhibitor at selective dose | Percentage enhancement of VIP-induced relaxation |
|---|---|
| $PDE_{cAMP}$ type 1 | 210% |
| $PDE_{cAMP}$ type 2 | 130% |
| $PDE_{cAMP}$ type 3 | 220% |
| $PDE_{cAMP}$ type 4 | 160% |
| $PDE_{cGMP}$ type 5 | No effect (30%) |
| Control - vehicle | No effect |

We have shown that VIP is also the endogenous NANC (non-adrenergic, non-cholinergic) neurotransmitter partially responsible for EFS-induced relaxations of isolated vaginal smooth muscle. A high dose of a nitric oxide synthase inhibitor (L-NOARG, 300μM) only inhibits 50% of EFS-induced relaxations. A NEP inhibitor

(1µM), which will prevent NEP-induced metabolism of VIP and hence enhance VIP signalling, enhances the non-nitric oxide NANC relaxation induced by EFS. We have shown that both NO and VIP regulate smooth muscle tone in the vaginal wall. Therapeutically it will be possible to enhance relaxations of vaginal smooth muscle with agents that enhance NO/cGMP and/or VIP/cAMP mediated signalling.

### 4.5 *Vaginal blood flow is enhanced by pharmacological agents that directly or indirectly elevate cAMP levels*

FSAD is associated with and may result from reduced vaginal blood flow. Potential approaches to treat this disorder revolve around enhancing vaginal blood flow. Having established that cAMP is the mediator of vaginal vasorelaxation and that elevations of cAMP result from neuronally released VIP, we believe that if cAMP signalling is enhanced, then as a consequence vaginal blood flow will be increased, hence restoring vaginal blood flow to normal levels and treating FSAD. We have initially chosen 3 targets to directly or indirectly enhance cAMP-mediated vasorelaxation - $PDE_{cAMP}$ inhibitors, NEP (EC 3.4.24.11) inhibitors and neuropeptide Y (NPY) receptor antagonists.

#### 4.5.1 Neutral Endopeptidase (NEP EC 3.4.24.11) inhibitors

NEP EC3.4.24.11 metabolises VIP and hence terminates VIP-mediated biological activity. NEP inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of VIP released during arousal. This will have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

There have been no previous literature reports of NEP EC3.4.24.11 localisation or of it's functional role in vaginal tissue or a role in sexual arousal.

Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 at clinically relevant doses significantly enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow (See Figure 5).

A NEP inhibitor enhanced the peak increase in vaginal blood flow by up to 53% compared to time matched control increases. This enhancement of submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz), was dose dependant eg 0.1mg/kg iv induced a 35.0±7.6% increase; 0.3mg/kg iv induced a 42.6.0±27.7% increase and 1.0mg/kg iv induced a 52.8±32.5% increase. NEP inhibitors had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow. Hence, the agents of the present invention enhance arousal, by potentiating cAMP signalling, rather than induce arousal in the absence of sexual desire ie by direct increasing cAMP signalling.

Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11, at clinically relevant doses, enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow when compared to time-matched controls. At submaximal doses of VIP (eg. 0.3µg/kg) a significant potentiation in both the peak increase (95±6%) and prolongation of the duration of the enhancement (*circa* 140% - from 7 to in excess of 17 minutes; See Figure 6). NEP inhibitors significantly prolong the duration of VIP-induced elevation of vaginal blood flow when given in combination with dose of VIP that produce maximal flow increases (*circa* 80% increase in duration - 11 to 20 minutes).

NEP inhibitors at clinically relevant doses significantly enhance VIP-induced and nerve-mediated relaxations in isolated tissue. The $EC_{50}$ for VIP is significantly reduced from 18.8±0.6nM to 2.9±0.3nM in the presence of a selective NEP inhibitor (1µM). The effect of the NEP inhibitor is concentration dependent.
NEP EC 3.4.24.11 mRNA message and protein is expressed and has been identified in human and rabbit vagina by Northern and Western analyses.

4.5.2 Phosphodiesterase (PDE) inhibitors

cAMP is degraded by cAMP-hydrolysing PDEs ie. $PDE_{cAMP}$. $PDE_{cAMP}$ inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of cAMP released during arousal. This should have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

There are no literature reports of $PDE_{cAMP}$ localisation or of a functional role of these isozymes in vaginal tissue or a role in sexual arousal. We have shown by PDE profiling of human and rabbit vagina that the following $PDE_{cAMP}$ 1, 2, 3, 4, 7 & 8 isozymes are present. Inhibitors of these $PDE_{cAMP}$ represent potential agents to enhance vaginal blood flow and/or relax vaginal smooth muscle.

A selective inhibitor of $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor at clinically relevant doses significantly enhances pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow (See Figure 7). A $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor (500µg/kg; iv) enhanced the peak increase in vaginal blood flow by 86.8±21.9% compared to increases observed during time matched control (@4Hz).

$PDE_{cAMP}$ inhibitors enhance VIP-induced relaxations of precontracted isolated vaginal smooth muscle (1μM phenylephrine; See Table 1). Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ types 1, 2, 3 and 4 all significantly potentiated VIP-mediated relaxations. (210% @ 76nM, 130% @ 8nM, 220% @ 3.4μM and 160% @ 686nM potentiation of VIP $EC_{50}$ values) These inhibitors were administered at dose known to be selective for the particular $PDE_{cAMP}$ of interest. A selective inhibitor of $PDE_{cGMP}$ type 5 or vehicle control had no viable effect on VIP-mediated relaxations.

### 4.5.3 NPY receptor antagonists

NPY exerts an inhibitory influence over VIP-mediated vasorelaxation and NPY receptor antagonists will facilitate the vasorelaxant effect of endogenous VIP released during arousal. This will have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

There are no literature reports of NPY receptor localisation or of a functional role for these receptors in vaginal tissue or a role in sexual arousal.

NPY receptor expression studies have identified by Northern and Western analyses that NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes are present in human and rabbit vagina.

### 4.6 *Effects of agents that enhance cAMP or increase vaginal blood flow on the mean arterial blood pressure in the anaesthetised rabbit*

In the search for an oral therapy for FSAD it is desirable that that there are no associated adverse cardiovascular effects eg effect on blood pressure or heart rate. In our studies, we have found that infusions of VIP significantly reduce mean arterial blood pressure (See Figure 3) and significantly increased heart rate. Hence, in a highly preferred aspect, the agent is not VIP. Pelvic nerve stimulation and inhibitors of $PDE_{cAMP}$ and NEP however had no effect on blood pressure. At 0.3μg/kg VIP (*iv*), caused a significant reduction in mean arterial blood pressure of 13.2±0.7mm Hg and a significant increase in heart rate of 16±4 beats per minute. At higher doses such as 3.0μg/kg VIP (*iv*) caused significant reduction in mean arterial blood pressure of

14.7±1.37mm Hg and this was associated with a significant increase in heart rate of 111±30 beats per minute which then increased mean arterial blood pressure by 8.5±1.4mm Hg.

## COMPOUNDS TESTED

Figure 8 presents a series of compounds that were tested in accordance with the present invention and were found to be effective in accordance with the present invention – i.e. they can act as $P_{cAMP}$ in order to treat FSD, in particular FSAD.

In more detail:

Compound of Formula Ia ("FIa") is 5-[4-(diethylamino)benzyl]-1-methyl-3-propyl-6,7-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one. FI may be prepared according to the teachings of EP-A-0911333 (Example 50 thereof).

Compound of Formula II ("FII") is 9-(1-acetyl-4-phenylbutyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-one. FII may be prepared according to the teachings of EP-A-0771799 (Example 100 thereof).

Compound of Formula III ("FIII") is Milrinone. FIII is a commercially available product.

Compound of Formula IV ("FIV") is Rolipram. FIV is a commercially available product.

Compound of Formula V ("FV") is cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[[1-(2-carboxy-4-pentenyl)cyclopentyl]carbonyl]amino]-,1-ethyl ester. FV may be prepared according to the teachings of EP-A-0274234 (Example 300 thereof).

Compound of Formula VI ("FVI") is cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[[1-(2-carboxy-4-pentenyl)cyclopentyl]carbonyl]amino]-. FVI may be prepared according to the teachings of EP-A-0274234 (Example 379 thereof).

In particular, FI, FII, FIII and FIV are $PDE_{cAMP}$ inhibitors. FI is a I:PDEI, FII is a I:PDEII, FIII is a I:PDEIII and FIV is a I:PDEIV.

651 / 75

The data for these compounds are presented above in the previous Example sections – for example see Table I.

As is evident, these $PDE_{cAMP}$ inhibitors enhance VIP-induced relaxations of isolated tissue.

FII – which is a selective I:PDEII - enhances VIP-induced increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FII also enhances pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI are selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11.

The data presented above in the previous Example sections are for FVI. However, similar results were obtained for FV.

As is evident, FV and FVI enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI also enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI also enhance VIP-induced and nerve-mediated relaxations of isolated tissue at clinically relevant doses.

## CONCLUSIONS

We have developed an animal model that mimics the physiological arousal response observed during female sexual arousal and directly reflects the clinical data obtained in human volunteers. The model uses Laser Doppler technologies to record small changes in vaginal blood flow induced by pelvic nerve stimulation or vasoactive transmitters. During sexual arousal, there is an increase in vaginal blood flow resulting from increased innervation from the pelvic nerve. The pelvic nerve-stimulated increase in vaginal blood flow, observed in the animal model, represents the endogenous vascular effects observed during female sexual arousal. Therefore this model can be used to firstly, identify the mechanisms involved in the regulation of vaginal blood flow and secondly, use the model to validate novel approaches for the enhancement of vaginal blood flow.

This study has successfully used a combination of *in vivo*, *in vitro* and biochemical techniques to identify cAMP as the mediator/second messenger regulating vaginal vasorelaxation (and vaginal wall relaxation). Using this animal model we have demonstrated that VIP-mediated increases in vaginal blood flow result from elevation of tissue cAMP, whereas previously VIP had been shown to increase vaginal blood flow in healthy volunteers but the cellular mechanism was not identified. Additionally, we have demonstrated that vaginal blood flow can be enhanced directly with a cAMPmimetic or indirectly by elevating cAMP concentrations.

The major cause of FSAD is decreased genital blood flow and this manifests itself as reduced vaginal, labial and clitoral engorgement. Treatment of women with FSAD is achievable by restoration of the *normal* sexual arousal response. This can be achieved by enhancing genital blood flow. Our approach for the treatment of FSAD will be to enhance vaginal blood flow/lubrication by either directly or indirectly potentiating endogenous cAMP signalling eg with an inhibitor of NEP (EC 3.4.24.11) or a cAMP-hydrolysing PDE inhibitor or a NPY receptor antagonist. This will have the overall effect of restoring or mimicking the *normal* arousal response with no cardiovascular side effects. Sexual arousal/engorgement will be enhanced, rather than simply being induced in the absence of sexual drive, which may be the case with some exogenously administered vasoactive agents eg VIP.

All publications mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described methods and system of the present invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the present invention. Although the present invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in biochemistry and biotechnology or related fields are intended to be within the scope of the following claims. For example, the present invention also encompasses administration of the agent of the present invention before and/or during sexual stimulation. This is advantageous because it provides systemic selectivity. The natural cascade only occurs at the genitalia and not the heart etc, hence it would be possible to achieve a selective effect on the genitalia.

## GENERAL TEXT REFERENCES

Ashur-Fabian, O., Perl ,O., Lilling, G., *et al.* (1999). SNV, a lipophilic superactive VIP analog, acts through cGMP to promote neuronal survival. *Peptides*, **20**, 629-633.

Berman, J.R., Berman, L. & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: Incidence, pathophysiology, evaluation, and treatment options. *Urology*, **54**, 385-391.

Berman, J., Goldstein, I., Werbin, T. *et al.* (1999a). Double blind placebo controlled study with crossover to assess effect of sildenafil on physiological parameters of the female sexual response. *J. Urol.*, **161**, 805.

*Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV*, American Psychiatric Association: Washington, DC., 1987, pp 493-518.

Fan, Y.P., Chakder, S. & Ratton, S. (1998). Inhibitory effect of zinc protoporphyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal polypeptide and other receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 468-474.

Foda, H.D., Sharaf, H.H., Absood, A. *et al.* (1995). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides*, **16**, 1057-1061.

Frank, E., Anderson, C. & Rubinstein, D. (1978). Frequency of sexual dysfunction in "normal" couples. *N. Engl. J. Med.*, **229**, 111-115.

Goldstein, I. & Berman, J.R. (1998). Vasculogenic female sexual dysfunction: vaginal engorgement and clitoral erectile insufficiency syndromes. *Int. J. Impot. Res.*, **10**, S84-S90.

Gu, Z.F., Jensen, R.T. & Maton, P.N. (1992). A primary role for protein kinase A in smooth muscle relaxation induced by adrenergic agonists and neuropeptides. *Am. J. Physiol.*, **263**, G360-G364.

Hoyle, C.H.V., Stones, R.W., Robson, T. *et al.* (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide containing nerves. *J. Anat.*, **188**, 633-644.

Ingenhoven, N. & Beck-Sickinger, A.G. (1997). Flourescent labelled analogues of neuropeptide Y for the characterisation of cells expressing NPY receptor subtypes. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 17, 407-418.

Jovanovic, A., Jovanovic, S., Tulic,. I. *et al.* (1998). Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Human Reprod.*, 4, 71-76.

Kaplan, H.S. (1974). The New Sex Therapy. London, Baillière Tindall.

Kaplan, S.A., Reis, R.B., Kohm, I.J. *et al.* (1999). Safety and efficacy of sildenafil in postmenopausal women with sexual dysfunction. *Urology*, 53, 481-486.

Kim, Y.C., Choi, H.K., Ahn, Y.S., *et al.* (1994). The effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on rabbit cavernosal smooth muscle contractility. *J. Androl.*, 15, 392-739.

Laan, E. & Everaerd, W. (1998). Physiological measures of vaginal vasocongestion. *Int. J. Impot. Res.*, 10, S107-S110.

Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, 10, S104-S106.

Levin, R.J. (1980). The physiology of sexual function in women. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 7, 213-252.

Levin, R.J. (1991). VIP, vagina, clitoral and preurethral glans: An update on female genital arousal. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 98, 61-69.

Levin, R.J. (1992). The mechanisms of human female sexual arousal. *Ann. Rev. Sex Res.*, 3, 1-48.

Levin, R.J. & Wagner, G. (1986). TRH and vaginal blood flow-effects in concious women and anaesthetised sheep. *J. Physiol.*, 373, 83P.

Lundberg, J.M., Modin, A. & Malmstrom, R.E. (1996). Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **17**, 301-304.

Masters, W.H., Johnson, V.E. *Human Sexual Response*. Little, Brown: Boston, 1996.

Ottesen, B., Gerstenberg, T., Ulrichsen, H. *et al.* (1983). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases vaginal blood flow and inhibits smooth muscle activity in women. *Eur. J. Clin. Invest.*, **13**, 321-324.

Ottesen, B., Wagner, G. & Fahrenkrug, J. *Peptide innervation of the sexual organs.* In: Handbook of Sexology, Vol. 6, The Pharmacological and Endocrinology of Sexual Function, Sitsen, J.M.A. (eds), Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1988), chapter 4, pp 66-97.

Ottensen, B., Pedersen, B., Nielsen, J. *et al.* (1987). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides*, **8**, 797-800.

Park, K., Goldstein, I., Andry, C., *et al.* (1997). Vasculogenic female sexual dysfunction: The hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. *Int. J. Impotence Res.*, **9**, 27-37.

Rosen, R., Taylor, J., Leiblum, S. *et al.* (1993). Prevalence of sexual dysfunction in women: results of a survey of 329 women in an outpatient gynecological clinic. *J. Sex Marital Ther.*, **19**, 171-188.

Schiavi, R.C. & Seagraves, R.T. (1995). The biology of sexual function. *Psychiat. Clin. North. Am.*, **18**, 7-23.

Schoeffter, P. & Stoclet, J.C. (1985). Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, **109**, 275-279.

Serradeil-Le Gal, C., Valette, G., Rouby, P.E. *et al.* (1995). SR 120819A, an orally-active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Letters*, **3**, 192-196.

Sjoberg, I. (1992). The vagina: Morphological, functional and ecological aspects. *Acta Obst. Gynecol. Scand.*, 71, 84-85.

Spector, I.P. & Carey, M.P. (1990). Incidence and prevalence of sexual dysfunctions: a critical review of the empirical literature. *Arch. Sex. Behav.*, 19, 389-408.

Wagner, G. (1992). Aspects of genital physiology and pathology. *Sem. Neurol.*, 12, 87-97.

Werbin, T., Salimpour, P., Berman, L., et al. (1999). Effect of sexual stimulation and age on genital blood flow in women with sexual stimulation. *J. Urol.*, 161, 688

Wincze, J.P., Albert, A. & Bansal, S. (1993). Sexual arousal in diabetic females: Physiological and self-report measures. *Arch. Sex Behav.*, 22, 587-601.

Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M. *et al.* (1995). Subtype selectivity and antagonist profile of the nonpeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J Pharmacol Exp Ther.*, 275, 143-9.

654 ₣

## REFERENCES FOR THE PDE SECTION

Han, P.; Fletcher, C. F.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Yaremko, L. M.; Michaeli, T. : Assignment of the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3 and of the human PDE7A gene to chromosome 8q13. Genomics 48: 275-276, 1998.

2. Michaeli, T.; Bloom, T. J.; Martins, T.; Loughney, K.; Ferguson, K.; Riggs, M.; Rodgers, L.; Beavo, J. A.; Wigler, M. : Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 268: 12925-12932, 1993.

3. Milatovich, A.; Bolger, G.; Michaeli, T.; Francke, U. : Chromosome localizations of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse. Somat. Cell Molec. Genet. 20: 75-86, 1994.

4. Rosman, G. J.; Martins, T. J.; Sonnenburg, W. K.; Beavo, J. A.; Ferguson, K.; Loughney, K. : Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3-prime,5-prime-cyclic nucleotide phosphodiesterase. Gene 191: 89-95, 1997.

## REFERENCES FOR THE NEP SECTION

1. Barker, P. E.; Shipp, M. A.; D'Adamio, L.; Masteller, E. L.; Reinherz, E. L. The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3(q21-q27). J. Immun. 142: 283-287, 1989.

2. D'Adamio, L.; Shipp, M. A.; Masteller, E. L.; Reinherz, E. L. : Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5-prime untranslated regions. Proc. Nat. Acad. Sci. 86: 7103-7107, 1989.

3. Letarte, M.; Vera, S.; Tran, R.; Addis, J. B. L.; Onizuka, R. J.; Quackenbush, E. J.; Jongeneel, C. V.; McInnes, R. R. : Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. J. Exp. Med. 168: 1247-1253, 1988.

4. Shipp, M. A.; Vijayaraghavan, J.; Schmidt, E. V.; Masteller, E. L.; D'Adamio, L.; Hersh, L. B.; Reinherz, E. L. : Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ('enkephalinase'): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. 86: 297-301, 1989.

5. Tran-Paterson, R.; Willard, H. F.; Letarte, M. : The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase--3.4.24.11) gene is located on human chromosome 3. Cancer Genet. Cytogenet. 42: 129-134, 1989.

## REFERENCES FOR THE NPY SECTION

1. Allen, J. M.; Bloom, S. R. : Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8: 1-8, 1986.

2. Bahary, N.; Zorich, G.; Pachter, J. E.; Leibel, R. L.; Friedman, J. M. : Molecular genetic linkage maps of mouse chromosomes 4 and 6. Genomics 11: 33-47, 1991.

3. Baker, E.; Hort, Y. J.; Ball, H.; Sutherland, G. R.; Shine, J.; Herzog, H. : Assignment of the human neuropeptide Y gene to chromosome 7p15.1 by nonisotopic in situ hybridization. Genomics 26: 163-164, 1995.

5. Carr, L. G.; Foroud, T.; Bice, P.; Gobbett, T.; Ivashina, J.; Edenberg, H.; Lumeng, L.; Li, T. K. : A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. Alcohol Clin. Exp. Res. 22: 884-887, 1998.

5. Dockray, G. J. : Neuropeptide Y: in search of a function. Neurochem. Int. 8: 9-11, 1986.

6. Erickson, J. C.; Clegg, K. E.; Palmiter, R. D. : Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. Nature 381: 415-421, 1996. PubMed ID : 8632796

7. Erickson, J. C.; Hollopeter, G.; Palmiter, R. D. : Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274: 1704-1706, 1996.

8. Karvonen, M. K.; Pesonen, U.; Koulu, M.; Niskanen, L.; Laakso, M.; Rissanen, A.; Dekker, J. M.; 't Hart, L. M.; Valve, R.; Uusitupa, M. I. : Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. Nature Med. 4: 1434-1437, 1998.

9. Maccarrone, C.; Jarrott, B. : Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8: 13-22, 1986.

10. Meisler, M. H.; Spence, J. E.; Dixon, J. E.; Caldwell, R. M.; Minth, C. D.; Beaudet, A. L. : Exclusion of close linkage between the loci for cystic fibrosis and neuropeptide Y on human chromosome 7. Cytogenet. Cell Genet. 44: 175-176, 1987.

11. Minth, C. D.; Andrews, P. C.; Dixon, J. E. : Characterization, sequence, and expression of the cloned human neuropeptide Y gene. J. Biol. Chem. 261: 11974-11979, 1986.

12. Minth, C. D.; Bloom, S. R.; Polak, J. M.; Dixon, J. E. : Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 4577-4581, 1984.

13. Takeuchi, T.; Gumucio, D.; Eddy, R.; Meisler, M.; Minth, C.; Dixon, J.; Yamada, T.; Shows, T. : Assignment of the related pancreatic polypeptide (PPY) and neuropeptide Y (NPY) genes to regions on human chromosomes 17 and 7. (Abstract) Cytogenet. Cell Genet. 40: 759 only, 1985.

14. Takeuchi, T.; Gumucio, D. L.; Yamada, T.; Meisler, M. H.; Minth, C. D.; Dixon, J. E.; Eddy, R. E.; Shows, T. B. : Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. J. Clin. Invest. 77: 1038-1041, 1986.

15. Terenghi, G.; Polak, J. M.; Hamid, Q.; O'Brien, E.; Denny, P.; Legon, S.; Dixon, J.; Minth, C. D.; Palay, S. L.; Yasargil, G.; Chan-Palay, V. : Localization of neuropeptide Y mRNA in neurons of human cerebral cortex by means of in situ hybridization with a complementary RNA probe. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 7315-7318, 1987.

16. Thiele, T. E.; Marsh, D. J.; Ste. Marie, L.; Bernstein, I. L.; Palmiter, R. D. : Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. Nature 396: 366-369, 1998.

17. Uusitupa, M. I. J.; Karvonen, M. K.; Pesonen, U.; Koulu, M. : Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism. Ann. Med. 30: 508-510, 1998.

## REFERENCES FOR THE NPYR1 SECTION

1. Herzog, H.; Baumgartner, M.; Vivero, C.; Selbie, L. A.; Auer, B.; Shine, J. : Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor. J. Biol. Chem. 268: 6703-6707, 1993.

2. Herzog, H.; Darby, K.; Ball, H.; Hort, Y.; Beck-Sickinger, A.; Shine, J. : Overlapping gene structure of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests coordinate transcriptional regulation. Genomics 41: 315-319, 1997.

3. Herzog, H.; Hort, Y. J.; Ball, H. J.; Hayes, G.; Shine, J.; Selbie, L. A. : Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. Proc. Nat. Acad. Sci. 89: 5794-5798, 1992.

4. Larhammar, D.; Blomqvist, A. G.; Yee, F.; Jazin, E.; Yoo, H.; Wahlestedt, C. : Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. J. Biol. Chem. 267: 10935-10938, 1992.

5. Lutz, C. M.; Frankel, W. N.; Richards, J. E.; Thompson, D. A. : Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

## REFERENCES FOR THE NPYR2 SECTION

1. Ammar, D. A.; Eadie, D. M.; Wong, D. J.; Ma, Y.-Y.; Kolakowski, L. F., Jr.; Yang-Feng, T. L.; Thompson, D. A. : Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide Y receptor gene. Genomics 38: 392-398, 1996.

2. Gerald, C.; Walker, M. W.; Vaysse, P. J.-J.; He, C.; Branchek, T. A.; Weinshank, R. L. : Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. J. Biol. Chem. 270: 26758-26761, 1995.

3. Lutz, C. M.; Frankel, W. N.; Richards, J. E.; Thompson, D. A. : Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

4. Rose, P. M.; Fernandes, P.; Lynch, J. S.; Frazier, S. T.; Fisher, S. M.; Kodukula, K.; Kienzle, B.; Seethala, R. : Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. J. Biol. Chem. 270: 22661-22664, 1995.

## REFERENCES FOR THE VIP SECTION

1. Bodner, M.; Fridkin, M.; Gozes, I. : Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3548-3551, 1985.

2. Gotoh, E.; Yamagami, T.; Yamamoto, H.; Okamoto, H. : Chromosomal assignment of human VIP/PHM-27 gene to 6q26-q27 region by spot blot hybridization and in situ hybridization. Biochem. Int. 17: 555-562, 1988.

3. Gozes, I.; Avidor, R.; Yahav, Y.; Katznelson, D.; Croce, C. M.; Huebner, K. : The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21-6qter. Hum. Genet. 75: 41-44, 1987.

4. Gozes, I.; Nakai, H.; Byers, M.; Avidor, R.; Weinstein, Y.; Shani, Y.; Shows, T. B. : Sequential expression in the nervous system of C-MYB and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24. Somat. Cell Molec. Genet. 13: 305-313, 1987.

5. Heinz-Erian, P.; Dey, R. D.; Flux, M.; Said, S. I. : Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. Science 229: 1407-1408, 1985.

6. Itoh, N.; Obata, K.; Yanaihara, N.; Okamoto, H. : Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature 304: 547-549, 1983.

7. Linder, S.; Barkhem, T.; Norberg, A.; Persson, H.; Schalling, M.; Hokfelt, T.; Magnusson, G. : Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 605-609, 1987.

8. Omary, M. B.; Kagnoff, M. F. : Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line. Science 238: 1578-1581, 1987.

## REFERENCES FOR THE AC SECTION

1. Parma, J.; Stengel, D.; Gannage, M.-H.; Poyard, M.; Barouki, R.; Hanoune, J. : Sequence of a human brain adenylyl cyclase partial cDNA: evidence for a consensus cyclase domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 455-462, 1991.

2. Stengel, D.; Parma, J.; Gannage, M.-H.; Roeckel, N.; Mattei, M.-G.; barouki, R.; Hanoune, J. : Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. Hum. Genet. 90: 126-130, 1992.

## REFERENCES FOR THE VPAC1 SECTION

1. Couvineau, A.; Rouyer-Fessard, C.; Darmoul, D.; Maoret, J.-J.; Carrero, I.; Ogier-Denis, E.; Laburthe, M. : Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains. Biochem. Biophys. Res. Commun. 200: 769-776, 1994.

2. Hashimoto, H.; Nishino, A.; Shintani, N.; Hagihara, N.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Yamamoto, K.; Matsuda, T.; Ishihara, T.; Nagata, S.; Baba, A. : Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VPAC-1) receptor. Genomics 58: 90-93, 1999.

3. Libert, F.; Passage, E.; Parmentier, M.; Simons, M.-J.; Vassart, G.; Mattei, M.-G. : Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonin receptor. Genomics 11: 225-227, 1991.

4. Sreedharan, S. P.; Huang, J.-X.; Cheung, M.-C.; Goetzl, E. J. : Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. Proc. Nat. Acad. Sci. 92: 2939-2943, 1995.

5. Sreedharan, S. P.; Patel, D. R.; Huang, J.-X.; Goetzl, E. J. : Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193: 546-553, 1993.

6. Sreedharan, S. P.; Robichon, A.; Peterson, K. E.; Goetzl, E. J. : Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. 88: 4986-4990, 1991.

7. Vassart, G. : Personal Communication. Brussels, Belgium, 1/15/1992. 8. Wenger, G. D. : Personal Communication. Columbus, Ohio, 8/3/1993.

## REFERENCES FOR THE VPAC2 SECTION

1. Adamou, J. E.; Aiyar, N.; Van Horn, S.; Elshourbagy, N. A. : Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commmun. 209: 385-392, 1995.

2. Mackay, M.; Fantes, J.; Scherer, S.; Boyle, S.; West, K.; Tsui, L.-C.; Belloni, E.; Lutz, E.; Van Heyningen, V.; Harmar, A. J. : Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. Genomics 37: 345-353, 1996.

3. Svoboda, M.; Tastenoy, M.; Van Rampelbergh, J.; Goossens, J.-F.; De Neef, P.; Waelbroeck, M.; Robberecht, P. : Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochem. Biophy. Res. Commun. 205: 1617-1624, 1994.

## SEQUENCE LISTINGS

## 1. NEP (EC 3.4.24.11)

```
LOCUS       HSMRNAEN     3181 bp    mRNA            PRI       12-SEP-1993
DEFINITION  Human mRNA for enkephalinase (EC 3.4.24.11).
ACCESSION   X07166
NID         g34757
VERSION     X07166.1  GI:34757
KEYWORDS    enkephalinase; metalloprotein; neutral endopeptidase.
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
            Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 3181)
  AUTHORS   Malfroy,B., Kuang,W.J., Seeburg,P.H., Mason,A.J. and Schofield,P.R.
  TITLE     Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase
            (neutral endopeptidase)
  JOURNAL   FEBS Lett. 229 (1), 206-210 (1988)
  MEDLINE   88152222
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..3181
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /tissue_type="placenta"
                     /clone_lib="lambda gt10"
                     /clone="lambda N7"
     CDS             18..2249
                     /note="enkephalinase (AA 1-743)"
                     /codon_start=1
                     /protein_id="CAA30157.1"
                     /db_xref="PID:g34758"
                     /db_xref="GI:34758"
                     /db_xref="SWISS-PROT:P08473"
                     /translation="MDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYAT
                     YDDGICKSSDCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKYACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDI
                     LRDELEVVLKDVLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINESAIDSRGGEPLLKLLPDIYGW
                     PVATENWEQKYGASWTAEKAIAQLNSKYGKKVLINLFVGTDDKNSVNHVIHIDQPRLG
                     LPSRDYYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDENQLALEMNKVMELEKEI
                     ANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSLEINGKPFSWLNFTNEIMSTVNISITNE
                     EDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTYKESRNAFRKALY
                     GTTSETATWRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDD
                     LTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNKLNNEYLELNYKEDEYFENIIQNL
                     KFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSL
                     NYGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSASNFKEQSQCMVYQYGNFSW
                     DLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLGQAYRAYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQLFFLN
                     FAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEKKC
                     RVW"
     misc_feature    3073..3078
                     /note="poly A signal"
```

```
BASE COUNT     1055 a    582 c    657 g    887 t
ORIGIN
        1 gcaagtcaga aagtcagatg gatataactg atatcaacac tccaaagcca aagaagaaac
       61 agcgatggac tccactggag atcagcctct cggtccttgt cctgctcctc accatcatag
      121 ctgtgacaat gatcgcactc tatgcaacct acgatgatgg tatttgcaag tcatcagact
      181 gcataaaatc agctgctcga ctgatccaaa acatggatgc caccactgag ccttgtacag
      241 actttttcaa atatgcttgc ggaggctggt tgaaacgtaa tgtcattccc gagaccagct
      301 cccgttacgg caactttgac attttaagag atgaactaga agtcgttttg aaagatgtcc
      361 ttcaagaacc caaaactgaa gatatagtag cagtgcagaa agcaaaagca ttgtacaggt
      421 cttgtataaa tgaatctgct attgatagca gaggtggaga acctctactc aaactgttac
      481 cagacatata tgggtggcca gtagcaacag aaaactggga gcaaaaatat ggtgcttctt
      541 ggacagctga aaaagctatt gcacaactga attctaaata tgggaaaaaa gtccttatta
      601 atttgtttgt tggcactgat gataagaatt ctgtgaatca tgtaattcat attgaccaac
      661 ctcgacttgg cctccccttct agagattact atgaatgcac tggaatctat aaagaggctt
      721 gtacagcata tgtggatttt atgatttctg tggccagatt gattcgtcag gaagaaagat
      781 tgcccatcga tgaaaaccag cttgctttgg aaatgaataa agttatggaa ttggaaaaag
      841 aaattgccaa tgctacggct aaacctgaag atcgaaatga tccaatgctt ctgtataaca
      901 agatgacatt ggcccagatc caaaataact tttcactaga gatcaatggg aagccattca
      961 gctggttgaa tttcacaaat gaaatcatgt caactgtgaa tattagtatt acaaatgagg
     1021 aagatgtggt tgtttatgct ccagaatatt taaccaaact taagcccatt cttaccaaat
     1081 attctgccag agatcttcaa aatttaatgt cctggagatt cataatggat cttgtaagca
     1141 gcctcagccg aacctacaag gagtccagaa atgctttccg caaggccctt tatggtacaa
     1201 cctcagaaac agcaacttgg agacgttgtg caaactatgt caatgggaat atggaaaatg
     1261 ctgtggggag gctttatgtg gaagcagcat ttgctggaga gagtaaacat gtggtcgagg
     1321 atttgattgc acagatccga gaagttttta ttcagacttt agatgacctc acttggatgg
     1381 atgccgagac aaaaaagaga gctgaagaaa aggccttagc aattaaagaa aggatcggct
     1441 atcctgatga cattgtttca aatgataaca aactgaataa tgagtacctc gagttgaact
     1501 acaaagaaga tgaatacttc gagaacataa ttcaaaattt gaaattcagc caaagtaaac
     1561 aactgaagaa gctccgagaa aaggtggaca aagatgagtg gataagtgga gcagctgtag
     1621 tcaatgcatt ttactcttca ggaagaaatc agatagtctt cccagccggc attctgcagc
     1681 ccccccttctt tagtgcccag cagtccaact cattgaacta tgggggcatc ggcatggtca
     1741 taggacacga aatcacccat ggcttcgatg acaatggcag aaactttaac aaagatggag
     1801 acctcgttga ctggtggact caacagtctg caagtaactt taaggagcaa tcccagtgca
     1861 tggtgtatca gtatggaaac ttttcctggg acctggcagg tggacagcac cttaatggaa
     1921 ttaatacact gggagaaaac attgctgata atggaggtct tggtcaagca tacagagcct
     1981 atcagaatta tattaaaaag aatggcgaag aaaaattact tcctggactt gacctaaatc
     2041 acaaacaact atttttcttg aactttgcac aggtgtggtg tggaacctat aggccagagt
     2101 atgcggttaa ctccattaaa acagatgtgc acagtccagg caatttcagg attattggga
     2161 ctttgcagaa ctctgcagag ttttcagaag cctttcactg ccgcaagaat tcatacatga
     2221 atccagaaaa gaagtgccgg gtttggtgat cttcaaaaga agcattgcag cccttggcta
     2281 gacttgccaa caccacagaa atggggaatt ctctaatcga aagaaaatgg gccctagggg
     2341 tcactgtact gacttgaggg tgattaacag agagggcacc atcacaatac agataacatt
     2401 aggttgtcct agaaagggtg tggagggagg aagggggtct aaggtctatc aagtcaatca
     2461 tttctcactg tgtacataat gcttaatttc taaagataat attactgttt atttctgttt
     2521 ctcatatggt ctaccagttt gctgatgtcc ctagaaaaca atgcaaaacc tttgaggtag
     2581 accaggattt ctaatcaaaa gggaaaagaa gatgttgaag aatacagtta ggcaccagaa
     2641 gaacagtagg tgacactata gtttaaaaca cattgcctaa ctactagttt ttacttttat
     2701 ttgcaacatt tacagtcctt caaaatcctt ccaaagaatt cttatacaca ttggggcctt
     2761 ggagcttaca tagttttaaa ctcatttttg ccatacatca gttattcatt ctgtgatcat
     2821 ttattttaag cactcttaaa gcaaaaaatg aatgtctaaa attgtttttt gttgtacctg
     2881 ctttgactga tgctgagatt cttcaggctt cctgcaattt tctaagcaat ttcttgctct
```

660

```
2941 atctctcaaa acttggtatt tttcagagat ttatataaat gtaaaaataa taattttttat
3001 atttaattat taactacatt tatgagtaac tattattata ggtaatcaat gaatattgaa
3061 gtttcagctt aaaataaaca gttgtgaacc aagatctata aagcgatata cagatgaaaa
3121 tttgagacta tttaaactta taaatcatat tgatgaaaag atttaagcac aaactttagg
3181 g
```

## 2. PDE type 1

```
LOCUS       HSPDE1A3A    2008 bp    mRNA            PRI       12-APR-1996
DEFINITION  Human 3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase (HSPDE1A3A) mRNA,
            complete cds.
ACCESSION   U40370
NID         g1151108
VERSION     U40370.1  GI:1151108
KEYWORDS    calmodulin-stimulated phosphodiesterase.
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2008)
  AUTHORS   Loughney,K., Martins,T.J., Harris,E.A., Sadhu,K., Hicks,J.B.,
            Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A. and Ferguson,K.
  TITLE     Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human
            calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide
            phosphodiesterases
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 271 (2), 796-806 (1996)
  MEDLINE   96132810
REFERENCE   2  (bases 1 to 2008)
  AUTHORS   Loughney,K., Martins,T.J., Harris,E.A.S., Sadhu,K., Hicks,J.B.,
            Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A. and Ferguson,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-NOV-1995) Kate Loughney, ICOS, 22021 20th Ave. S.E.,
            Bothell, WA 98021, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2008
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            85..1692
                     /gene="PDE1A"
     CDS             85..1692
                     /gene="PDE1A"
                     /note="PDE1A3; type I phosphodiesterase"
                     /codon_start=1
                     /product="3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase"
                     /protein_id="AAC50436.1"
                     /db_xref="PID:g1151109"
                     /db_xref="GI:1151109"
                     /translation="MGSSATEIEELENTTFKYLTGEQTEKMWQRLKGILRCLVKQLER
                     GDVNVVDLKKNIEYAASVLEAVYIDETRRLLDTEDELSDIQTDSVPSEVRDWLASTFT
                     RKMGMTKKKPEEKPKFRSIVHAVQAGIFVERMYRKTYHMVGLAYPAAVIVTLKDVDKW
                     SFDVFALNEASGEHSLKFMIYELFTRYDLINRFKIPVSCLITFAEALEVGYSKYKNPY
                     HNLIHAADVTQTVHYIMLHTGIMHWLTELEILAMVFAAAIHDYEHTGTTNNFHIQTRS
                     DVAILYNDRSVLENHHVSAAYRLMQEEEMNILINLSKDDWRDLRNLVIEMVLSTDMSG
                     HFQQIKNIRNSLQQPEGIDRAKTMSLILHAADISHPAKSWKLHYRWTMALMEEFFLQG
                     DKEAELGLPFSPLCDRKSTMVAQSQIGFIDFIVEPTFSLLTDSTEKIVIPLIEEASKA
                     ETSSYVASSSTTIVGLHIADALRRSNTKGSMSDGSYSPDYSLAAVDLKSFKNNLVDII
                     QQNKERWKELAAQEARTSSQKCEFIHQ"
```

```
BASE COUNT      627 a    400 c    437 g    544 t
ORIGIN
        1 gaattctgat gtgcttcagt gcacagaaca gtaacagatg agctgctttt ggggagagct
       61 tgagtactca gtcggagcat catcatgggg tctagtgcca cagagattga agaattggaa
      121 aacaccactt ttaagtatct tacaggagaa cagactgaaa aaatgtggca gcgcctgaaa
      181 ggaatactaa gatgcttggt gaagcagctg gaaagaggtg atgttaacgt cgtcgactta
      241 aagaagaata ttgaatatgc ggcatctgtg ctggaagcag tttatatcga tgaaacaaga
      301 agacttctgg atactgaaga tgagctcagt gacattcaga ctgactcagt cccatctgaa
      361 gtccgggact ggttggcttc tacctttaca cggaaaatgg ggatgacaaa aaagaaacct
      421 gaggaaaaac caaaatttcg gagcattgtg catgctgttc aagctggaat tttgtggaa
      481 agaatgtacc gaaaaacata tcatatggtt ggtttggcat atccagcagc tgtcatcgta
      541 acattaaagg atgttgataa atggtctttc gatgtatttg ccctaaatga agcaagtgga
      601 gagcatagtc tgaagtttat gatttatgaa ctgtttacca gatatgatct tatcaaccgt
      661 ttcaagattc ctgtttcttg cctaatcacc tttgcagaag ctttagaagt tggttacagc
      721 aagtacaaaa atccatatca caatttgatt catgcagctg atgtcactca aactgtgcat
      781 tacataatgc ttcatacagg tatcatgcac tggctcactg aactggaaat tttagcaatg
      841 gtctttgctg ctgccattca tgattatgag catacaggga caacaaacaa ctttcacatt
      901 cagacaaggt cagatgttgc cattttgtat aatgatcgct ctgtccttga gaatcaccac
      961 gtgagtgcag cttatcgact tatgcaagaa gaagaaatga atatcttgat aaatttatcc
     1021 aaagatgact ggagggatct tcggaaccta gtgattgaaa tggttttatc tacagacatg
     1081 tcaggtcact tccagcaaat taaaaatata agaaacagtt tgcagcagcc tgaagggatt
     1141 gacagagcca aaaccatgtc cctgattctc cacgcagcag acatcagcca cccagccaaa
     1201 tcctggaagc tgcattatcg gtggaccatg gccctaatgg aggagttttt cctgcaggga
     1261 gataaagaag ctgaattagg gcttccattt tcccccactt gtgatcggaa gtcaaccatg
     1321 gtggcccagt cacaaatagg tttcatcgat ttcatagtag agccaacatt ttctcttctg
     1381 acagactcaa cagagaaaat tgttattcct cttatagagg aagcctcaaa agccgaaact
     1441 tcttcctatg tggcaagcag ctcaaccacc attgtggggt tacacattgc tgatgcacta
     1501 agacgatcaa atacaaaagg ctccatgagt gatgggtcct attccccaga ctactccctt
     1561 gcagcagtgg acctgaagag tttcaagaac aacctggtgg acatcattca gcagaacaaa
     1621 gagaggtgga aagagttagc tgcacaagaa gcaagaacca gttcacagaa gtgtgagttt
     1681 attcatcagt aaacaccttt aagtaaaacc tcgtgcatgg tggcagctct aatttgacca
     1741 aaagacttgg agattttgat tatgcttgct ggaaatctac cctgtcctgt gtgagacagg
     1801 aaatctattt ttgcagattg ctcaataagc atcatgagcc acataaataa cagctgtaaa
     1861 ctccttaatt caccgggctc aactgctacc gaacagattc atctagtggc tacatcagca
     1921 ccttgtgctt tcagatatct gtttcaatgg cattttgtgg catttgtctt taccgagtgc
     1981 caataaattt tctttgagca aaaaaaa
//
```

## 3. PDE type 2

```
LOCUS       HSU67733     4240 bp    mRNA            PRI       21-MAY-1997
DEFINITION  Human cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase
            PDE2A3 (PDE2A) mRNA, complete cds.
ACCESSION   U67733
NID         g2108051
VERSION     U67733.1  GI:2108051
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 4240)
  AUTHORS   Rosman,G.J., Martins,T.J., Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A., Ferguson,K.
            and Loughney,K.
  TITLE     Isolation and characterization of human cDNAs encoding a
            cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase
  JOURNAL   Gene 191 (1), 89-95 (1997)
  MEDLINE   97354299
REFERENCE   2  (bases 1 to 4240)
  AUTHORS   Rosman,G.J., Martins,T.J., Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A., Ferguson,K.
            and Loughney,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (21-AUG-1996) Icos Corporation, 22021 20th Ave. S.E.,
            Bothell, WA 98021, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..4240
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            162..2987
                     /gene="PDE2A"
     CDS             162..2987
                     /gene="PDE2A"
                     /function="cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide
                     phosphodiesterase"
                     /note="PDE2 family; splice variant 3"
                     /codon_start=1
                     /product="PDE2A3"
                     /protein_id="AAC51320.1"
                     /db_xref="PID:g2108052"
                     /db_xref="GI:2108052"
                     /translation="MGQACGHSILCRSQQYPAARPAEPRGQQVFLKPDEPPPPPQPCA
                     DSLQDALLSLGSVIDISGLQRAVKEALSAVLPRVETVYTYLLDGESQLVCEDPPHELP
                     QEGKVREAIISQKRLGCNGLGFSDLPGKPLARLVAPLAPDTQVLVMPLADKEAGAVAA
                     VILVHCGQLSDNEEWSLQAVEKHTLVALRRVQVLQQRGPREAPRAVQNPPEGTAEDQK
                     GGAAYTDRDRKILQLCGELYDLDASSLQLKVLQYLQQETRASRCCLLLVSEDNLQLSC
                     KVIGDKVLGEEVSFPLTGCLGQVVEDKKSIQLKDLTSEDVQQLQSMLGCELQAMLCVP
                     VISRATDQVVALACAFNKLEGDLFTDEDEHVIQHCFHYTSTVLTSTLAFQKEQKLKCE
```

662

```
                    CQALLQVAKNLFTHLDDVEVLLQEIITEARNLSNAEICSVFLLDQNELVAKVFDGGVV
                    DDESYEIRIPADQGIAGHVATTGQILNIPDAYAHPLFYRGVDDSTGFRTRNILCFPIK
                    NENQEVIGVAELVNKINGPWFSKFDEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHL
                    ANEMMMYHMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQ
                    DMNFIKNYKIDCPTLARFCLMVKKGYRDPPYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLE
                    DIEIFALFISCMCHDLDHRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSVMERHHFAQAIAILNT
                    HGCNIFDHFSRKDYQRMLDLMRDIILATDLAHHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHHRL
                    LLCLLMTSCDLSDQTKGWKTTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIP
                    ELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNREHWTKVSHKFTIRGLPSNNSLD
                    FLDEEYEVPDLDGTRAPINGCCSLDAE*
BASE COUNT      902 a   1260 c   1202 g    876 t
ORIGIN
        1 cagcagagct ggattggggt gttgagtcca ggctgagtag ggggcagccc actgctcttg
       61 gtccctgtgc ctgctggggg tgccctgccc tgaactccag gcagcgggga cagggcgagg
      121 tgccacctta gtctggctgg ggaggcggac gatgaggagt gatggggcag gcatgcggcc
      181 actccatcct ctgcaggagc cagcagtacc cggcagcgcg accggctgag ccgcggggcc
      241 agcaggtctt cctcaagccg gacgagccgc cgccgccgcc gcagccatgc gccgacagcc
      301 tgcaggacgc cttgctgagt ctgggctctg tcatcgacat ttcaggcctg caacgtgctg
      361 tcaaggaggc cctgtcagct gtgctccccc gagtggaaac tgtctacacc tacctactgg
      421 atggtgagtc ccagctggtg tgtgaggacc ccccacatga gctgccccag gaggggaaag
      481 tccgggaggc tatcatctcc cagaagcggc tgggctgcaa tgggctgggc ttctcagacc
      541 tgccagggaa gcccttggcc aggctggtgg ctccactggc tcctgatacc caagtgctgg
      601 tcatgccgct agcggacaag gaggctgggg ccgtggcagc tgtcatcttg gtgcactgtg
      661 gccagctgag tgataatgag gaatggagcc tgcaggcggt ggagaagcat accctggtcg
      721 ccctgcggag ggtgcaggtc ctgcagcagc gcgggcccag ggaggctccc cgagccgtcc
      781 agaacccccc ggaggggacg gcggaagacc agaagggcgg ggcggcgtac accgaccgcg
      841 accgcaagat cctccaactg tgcggggaac tctacgacct ggatgcctct tccctgcagc
      901 tcaaagtgct ccaatacctg cagcaggaga cccgggcatc ccgctgctgc ctcctgctgg
      961 tgtcggagga caatctccag ctttcttgca aggtcatcgg agacaaagtg ctcggggaag
     1021 aggtcagctt tcccttgaca ggatgcctgg gccaggtggt ggaagacaag aagtccatcc
     1081 agctgaagga cctcacctcc gaggatgtac aacagctgca gagcatgttg ggctgtgagc
     1141 tgcaggccat gctctgtgtc cctgtcatca gccgggccac tgaccaggtg gtggccttgg
     1201 cctgcgcctt caacaagcta gaaggagact tgttcaccga cgaggacgag catgtgatcc
     1261 agcactgctt ccactacacc agcaccgtgc tcaccagcac cctggccttc cagaaggaac
     1321 agaaactcaa gtgtgagtgc caggctcttc tccaagtggc aaagaacctc ttcacccacc
     1381 tggatgacgt ctctgtcctg ctccaggaga tcatcacgga ggccagaaac ctcagcaacg
     1441 cagagatctg ctctgtgttc ctgctggatc agaatgagct ggtggccaag gtgttcgacg
     1501 gggcgtggt ggatgatgag agctatgaga tccgcatccc ggccgatcag ggcatcgcgg
     1561 gacacgtggc gaccacgggc cagatcctga acatccctga cgcatatgcc catccgcttt
     1621 tctaccgcgg cgtggacgac agcaccggct tccgcacgcg caacatcctc tgcttcccca
     1681 tcaagaacga gaaccaggag gtcatcggtg tggccgagct ggtgaacaag atcaatgggc
     1741 catggttcag caagttcgac gaggacctgg cgacggcctt ctccatctac tgcggcatca
     1801 gcatcgccca ttctctccta tacaaaaaag tgaatgaggc tcagtatcgc agccacctgg
     1861 ccaatgagat gatgatgtac cacatgaagg tctccgacga tgagtatacc aaacttctcc
     1921 atgatgggat ccagcctgtg gctgccattg actccaattt tgcaagtttc acctataccc
     1981 ctcgttccct gcccgaggat gacacgtcca tggccatcct gagcatgctg caggacatga
     2041 atttcatcaa caactacaaa attgactgcc cgaccctggc ccggttctgt ttgatggtga
     2101 agaagggcta ccgggatccc ccctaccaca actggatgca cgccttttct gtctcccact
     2161 tctgctacct gctctacaag aacctggagc tcaccaacta cctcgaggac atcgagatct
     2221 ttgccttgtt tatttcctgc atgtgtcatg acctggacca cagaggcaca aacaactctt
     2281 tccaggtggc ctcgaaatct gtgctggctg cgctctacag ctctgagggc tccgtcatgg
```

2341 agaggcacca ctttgctcag gccatcgcca tcctcaacac ccacggctgc aacatctttg
2401 atcatttctc ccggaaggac tatcagcgca tgctggatct gatgcgggac atcatcttgg
2461 ccacagacct ggcccaccat ctccgcatct tcaaggacct ccagaagatg gctgaggtgg
2521 gctacgaccg aaacaacaag cagcaccaca gacttctcct ctgcctcctc atgacctcct
2581 gtgacctctc tgaccagacc aagggctgga agactacgag aaagatcgcg gagctgatct
2641 acaaagaatt cttctcccag ggagacctgg agaaggccat gggcaacagg ccgatggaga
2701 tgatggaccg ggagaaggcc tatatccctg agctgcaaat cagcttcatg gagcacattg
2761 caatgcccat ctacaagctg ttgcaggacc tgttccccaa agcggcagag ctgtacgagc
2821 gcgtggcctc caaccgtgag cactggacca aggtgtccca caagttcacc atccgcggcc
2881 tcccaagtaa caactcgctg gacttcctgg atgaggagta cgaggtgcct gatctggatg
2941 gcactagggc ccccatcaat ggctgctgca gccttgatgc tgagtgatcc cctccaggac
3001 acttccctgc ccaggccacc tcccacagcc ctccactggt ctggccagat gcactgggaa
3061 cagagccacg ggtcctgggt cctagaccag gacttcctgt gtgaccctgg acaagtacta
3121 ccttcctggg cctcagcttt ctcgtctgta taatggaagc aagacttcca acctcacgga
3181 gactttgtaa tttgcttctc tgagagcaca ggggtgacca atgagcagtg ggccctactc
3241 tgcacctctg accacacctt ggcaagtctt tcccaagcca ttctttgtct gagcagcttg
3301 atggtttctc cttgccccat ttctgcccca ccagatcttt gctcctttcc ctttgaggac
3361 tcccaccctt tgggtctcca ggatcctcat ggaaggggaa ggtgagacat ctgagtgagc
3421 agagtgtggc atcttggaaa cagtccttag ttctgtggga ggactagaaa cagccgcggc
3481 gaaggccccc tgaggaccac tactatactg atggtgggat tgggacctgg gggatacagg
3541 ggcccccagga agaagctggc cagaggggca gctcagtgct ctgcagagag gggccctggg
3601 gagaagcagg atgggattga tgggcaggag ggatccccgc actgggagac aggcccaggt
3661 atgaatgagc cagccatgct tcctcctgcc tgtgtgacgc tgggcgagtc tcttcccctg
3721 tctgggccaa acagggagcg ggtaagacaa tccatgctct aagatccatt ttagatcaat
3781 gtctaaaata gctctatggc tctgcggagt cccagcagag gctatggaat gtttctgcaa
3841 ccctaaggca cagagagcca accctgagtg tctcagaggc cccctgagtg ttccccttgg
3901 cctgagcccc ttacccattc ctgcagccag tgagagacct ggcctcagcc tggcagcgct
3961 ctcttcaagg ccatatccac ctgtgccctg ggcttggga gaccccatag gccgggactc
4021 ttgggtcagc ccgccactgg cttctctctt tttctccgtt tcattctgtg tgcgttgtgg
4081 ggtgggggag gggtccacc tgccttacct ttctgagttg cctttagaga gatgcgtttt
4141 tctaggactc tgtgcaactg tcgtatatgg tcccgtgggc tgaccgcttt gtacatgaga
4201 ataaatctat ttctttctac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa

## 4. NPY

```
LOCUS       HUMNPY          551 bp    mRNA            PRI       07-JAN-1995
DEFINITION  Human neuropeptide Y (NPY) mRNA, complete cds.
ACCESSION   K01911
NID         g189273
VERSION     K01911.1  GI:189273
KEYWORDS    neuropeptide Y.
SOURCE      Human phaeochromocytoma, cDNA to mRNA, clone pNPY3-75.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 551)
  AUTHORS   Minth,C.D., Bloom,S.R., Polak,J.M. and Dixon,J.E.
  TITLE     Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA
            encoding neuropeptide tyrosine
  JOURNAL   Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 (14), 4577-4581 (1984)
  MEDLINE   84272678
COMMENT     Neuropeptide Y (NPY) is one of the most abundant peptides in the
            mammalian nervous system, and its extensive distribution suggests a
            neuro-transmitter or -modulator role. NPY is also found in some
            chromaffin cells of the adrenal medulla.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..551
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /tissue_type="phaeochromocytoma"
                     /map="7pter-q22"
     mRNA            <1..551
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
     gene            1..551
                     /gene="NPY"
     sig_peptide     87..170
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
     CDS             87..380
                     /gene="NPY"
                     /codon_start=1
                     /db_xref="GDB:G00-119-456"
                     /product="neuropeptide Y"
                     /protein_id="AAA59944.1"
                     /db_xref="PID:g189274"
                     /db_xref="GI:189274"
                     /translation="MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAED
                     MARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRLEDPAMW"
     mat_peptide     171..278
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
                     /product="neuropeptide Y"
BASE COUNT      131 a    171 c    129 g    120 t
ORIGIN      51 bp upstream of RsaI site.
        1 accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc
       61 ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgactgggg ctgtccggac
      121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgaggcg taccccctcca
      181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
      241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
      301 cactgatttc agacctcttg atgagagaaa gcacagaaaa tgttcccaga actcggcttg
      361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
      421 gcccatattt catcgtgtaa aacgagaatc cacccatcct accaatgcat gcagccactg
      481 tgctgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
      541 atcatgcatt c
```

664

## 5. NPY Y1 Receptor

```
LOCUS       A26481       2624 bp    mRNA            PAT       17-OCT-1995
DEFINITION  Human NPY receptor Y1 gene cDNA.
ACCESSION   A26481
NID         g1247452
VERSION     A26481.1  GI:1247452
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
            Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2624)
  AUTHORS   .
  TITLE     HUMAN NEUROPEPTIDE Y-Y1 RECEPTOR
  JOURNAL   Patent: WO 9309227-A 3 13-MAY-1993;
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2624
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     CDS             152..1306
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y Y1 receptor"
                     /protein_id="CAA01819.1"
                     /db_xref="PID:e205126"
                     /db_xref="PID:g1247453"
                     /db_xref="GI:1247453"
                     /db_xref="SWISS-PROT:P25929"
                     /translation="MNSTLFSQVENHSVHSNFSEKNAQLLAFENDDCHLPLAMIFTLA
                     LAYGAVIILGVSGNLALIIIILKQKEMRNVTNILIVNLSFSDLLVAIMCLPFTFVYTL
                     MDHWVFGEAMCKLNPFVQCVSITVSIFSLVLIAVERHQLIINPRGWRPNNRHAYVGIA
                     VIWVLAVASSLPFLIYQVMTDEPFQNVTLDAYKDKYVCFDQFPSDSHRLSYTTLLLVL
                     QYFGPLCFIFICYFKIYIRLKRRNNMMDKMRDNKYRSSETKRINIMLLSIVVAFAVCW
                     LPLTIFNTVFDWNHQIIATCNHNLLFLLCHLTAMISTCVNPIFYGFLNKNFQRDLQFF
                     FNFCDFRSRDDDYETIAMSTMHTDVSKTSLKQASPVAFKKINNNDDNEKI"
BASE COUNT      791 a    479 c    473 g    878 t       3 others
ORIGIN
        1 attgttcagt tcaagggaat gaagaattca gaataatttt ggtaaatgga ttccaatatc
       61 gggaataaga ataagctgaa cagttgacct gctttgaaga aacatactgt ccatttgtct
      121 aaaataatct ataacaacca aaccaatcaa aatgaattca acattatttt cccaggttga
      181 aaatcattca gtccactcta atttctcaga gaagaatgcc cagcttctgg cttttgaaaa
      241 tgatgattgt catctgccct tggccatgat atttacctta gctcttgctt atggagctgt
      301 gatcattctt ggtgtctctg gaaacctggc cttgatcata atcatcttga aacaaaagga
      361 gatgagaaat gttaccaaca tcctgattgt gaacctttcc ttctcagact tgcttgttgc
      421 catcatgtgt ctcccctttta catttgtcta cacattaatg gaccactggg tctttggtga
      481 ggcgatgtgt aagttgaatc cttttgtgca atgtgtttca atcactgtgt ccattttctc
      541 tctggttctc attgctgtgg aacgacatca gctgataatc aaccctcgag ggtggagacc
      601 aaataataga catgcttatg taggtattgc tgtgatttgg gtccttgctg tggcttcttc
      661 tttgcctttc ctgatctacc aagtaatgac tgatgagccg ttccaaaatg taacacttga
```

```
 721 tgcgtacaaa gacaaatacg tgtgctttga tcaatttcca tcggactctc ataggttgtc
 781 ttataccact ctcctcttgg tgctgcagta ttttggtcca ctttgtttta tatttatttg
 841 ctacttcaag atatatatac gcctaaaaag gagaaacaac atgatggaca agatgagaga
 901 caataagtac aggtccagtg aaaccaaaag aatcaatatc atgctgctct ccattgtggt
 961 agcatttgca gtctgctggc tcccctcttac catctttaac actgtgtttg attggaatca
1021 tcagatcatt gctacctgca accacaatct gttattcctg ctctgccacc tcacagcaat
1081 gatatccact tgtgtcaacc ccatatttta tgggttcctg aacaaaaact tccagagaga
1141 cttgcagttc ttcttcaact tttgtgattt ccggtctcgg gatgatgatt atgaaacaat
1201 agccatgtcc acgatgcaca cagatgtttc caaaacttct ttgaagcaag caagcccagt
1261 cgcatttaaa aaaatcaaca acaatgatga taatgaaaaa atctgaaact acttatagcc
1321 tatggtcccg gatgacatct gtttaaaaac aagcacaacc tgcaacatac tttgattacc
1381 tgttctccca aggaatgggg ttgaaatcat ttgaaaatga ctaagatttt cttgtcttgc
1441 tttttttactg cttttgttgt agtgtcataa ttacatttgg aacaaaaggt gtgggctttg
1501 gggtcttctg gaaatagttt tgaccagaca tctttgaagt gctttttgtg aatttatgca
1561 tataatataa agacttttat actgtactta ttggaatgaa atttctttaa agtattacga
1621 tnnnctgact tcagaagtac ctgccatcca atacggtcat tagattgggt catcttgatt
1681 agattagatt agattagatt gtcaacagat tgggccatcc ttactttatg ataggcatca
1741 ttttagtgtg ttacaatagt aacagtatgc aaaagcagca ttcaggagcc gaaagatagt
1801 cttgaagtca ttcagaagtg gtttgaggtt tctgtttttt ggtggttttt gtttgttttt
1861 tttttttttc accttaaggg aggctttcat ttcctcccga ctgattgtca cttaaatcaa
1921 aatttaaaaa tgaataaaaa gacatacttc tcagctgcaa atattatgga gaattgggca
1981 cccacaggaa tgaagagaga aagcagctcc ccaacttcaa aaccattttg gtacctgaca
2041 acaagagcat tttagagtaa ttaatttaat aaagtaaatt agtattgctg caaatagcta
2101 aattatattt atttgaattg atggtcaaga gattttccat tttttttaca gactgttcag
2161 tgtttgtcaa gcttctggtc taatatgtac tcgaaagact ttccgcttac aatttgtaga
2221 aacacaaata tcgttttcca tacagcagtg cctatatagt gactgatttt aactttcaat
2281 gtccatcttt caaaggaagt aacaccaagg tacaatgtta aaggaatatt cactttacct
2341 agcagggaaa aatacacaaa aactgcagat acttcatata gcccatttta acttgtataa
2401 actgtgtgac ttgtggcgtc ttataaataa tgcactgtaa agattactga atagttgtgt
2461 catgttaatg tgcctaattt catgtatctt gtaatcatga ttgagcctca gaatcatttg
2521 gagaaactat attttaaaga acaagacata cttcaatgta ttatacagat aaagtattac
2581 atgtgtttga ttttaaaagg gcggacattt tattaaaatc aagg
```

## 6. NPY Y2 Receptor

```
LOCUS       HSU36269     1200 bp    mRNA            PRI       14-NOV-1995
DEFINITION  Human neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor mRNA, complete cds.
ACCESSION   U36269
NID         g1063633
VERSION     U36269.1  GI:1063633
KEYWORDS    .
SOURCE      Human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1200)
  AUTHORS   Gerald,C., Walker,M.W., Vaysse,P.J., He,C., Branchek,T.A. and
            Weinshank,R.L.
  TITLE     Expression cloning and pharmacological characterization of a human
            hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 270 (45), 26758-26761 (1995)
  MEDLINE   96070760
REFERENCE   2  (bases 1 to 1200)
  AUTHORS   Gerald,C.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (13-SEP-1995) Christophe A. Gerald, Synaptic
            Pharmaceutical Corporation, Molecular Biology, 215 College Road,
            Paramus, NJ 07652, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1200
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /clone="bhY2"
                     /sex="male"
                     /tissue_type="brain hippocampus"
                     /dev_stage="adult"
     5'UTR           1..20
     CDS             21..1166
                     /note="NPY/PYY Y2 receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor"
                     /protein_id="AAC50281.1"
                     /db_xref="PID:g1063634"
                     /db_xref="GI:1063634"
                     /translation="MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGPQTTPRGELVPDPEPELIDST
                     KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTL
                     CLPFTLTYTLMGEWKMGPVLCHLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKI
                     SKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEKSIYGTV
                     YSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAANDHYHQRRQKTTKMLVCVVVV
                     FAVSWLPLHAFQLAVDIDSQVLDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRK
                     AFLSAFRCEQRLDAIHSEVSVTFKAKKNLEVRKNSGPNDSFTEATNV"
     3'UTR           1164..1200
```

```
BASE COUNT      292 a    295 c    299 g    314 t
ORIGIN
        1 caagtggacc tgtactgaaa atgggtccaa taggtgcaga ggctgatgag aaccagacag
       61 tggaagaaat gaaggtggaa caatacgggc cacaaacaac tcctagaggt gaactggtcc
      121 ctgaccctga gccagagctt atagatagta ccaagctgat tgaggtacaa gttgttctca
      181 tattggccta ctgctccatc atcttgcttg ggtaattgg caactccttg gtgatccatg
      241 tggtgatcaa attcaagagc atgcgcacag taaccaactt tttcattgcc aatctggctg
      301 tggcagatct tttggtgaac actctgtgtc taccgttcac tcttacctat accttaatgg
      361 gggagtggaa aatgggtcct gtcctgtgcc acctggtgcc ctatgcccag ggcctggcag
      421 tacaagtatc cacaatcacc ttgacagtaa ttgccctgga ccggcacagg tgcatcgtct
      481 accacctaga gagcaagatc tccaagcgaa tcagcttcct gattattggc ttggcctggg
      541 gcatcagtgc cctgctggca agtcccctgg ccatcttccg ggagtattcg ctgattgaga
      601 tcatcccgga ctttgagatt gtggcctgta ctgaaaagtg gcctggcgag gagaagagca
      661 tctatggcac tgtctatagt ctttcttcct tgttgatctt gtatgttttg cctctgggca
      721 ttatatcatt ttcctacact cgcatttgga gtaaattgaa gaaccatgtc agtcctggag
      781 ctgcaaatga ccactaccat cagcgaaggc aaaaaaccac caaaatgctg gtgtgtgtgg
      841 tggtggtgtt tgcggtcagc tggctgcctc tccatgcctt ccagcttgcc gttgacattg
      901 acagccaggt cctggacctg aaggagtaca aactcatctt cacagtgttc cacatcatcg
      961 ccatgtgctc cacttttgcc aatcccctte tctatggctg gatgaacagc aactacagaa
     1021 aggctttcct ctcggccttc cgctgtgagc agcggttgga tgccattcac tctgaggtgt
     1081 ccgtgacatt caaggctaaa aagaacctgg aggtcagaaa gaacagtggc cccaatgact
     1141 ctttcacaga ggctaccaat gtctaaggaa gctgtggtgt gaaaatgtat ggatgaattc
```

## 7. NPY Y5 Receptor

```
LOCUS       HSU66275     1370 bp    mRNA            PRI       18-OCT-1996
DEFINITION  Human neuropeptide Y5 receptor (NPYR5) mRNA, complete cds.
ACCESSION   U66275
NID         g1620655
VERSION     U66275.1  GI:1620655
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1370)
  AUTHORS   Hu,Y., Bloomquist,B.T., Cornfield,L.J., DeCarr,L.B.,
            Flores-Riveros,J.R., Friedman,L., Jiang,P., Lewis-Higgins,L.,
            Sadlowski,Y., Schaefer,J., Velazquez,N. and McCaleb,M.L.
  TITLE     Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor
            associated with feeding behavior
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 271 (42), 26315-26319 (1996)
  MEDLINE   96421636
REFERENCE   2  (bases 1 to 1370)
  AUTHORS   Hu,Y., Bloomquist,B.T., Cornfield,L.J., DeCarr,L.B.,
            Flores-Riveros,J.R., Friedman,L., Jiang,P., Lewis-Higgins,L.,
            Sadlowski,Y., Schaefer,J., Velazquez,N. and McCaleb,M.L.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-AUG-1996) Metabolic Disorders, Bayer Corporation, 400
            Morgan Lane, West Haven, CT 06516, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1370
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            18..1355
                     /gene="NPYR5"
     CDS             18..1355
                     /gene="NPYR5"
                     /function="G protein-coupled receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y5 receptor"
                     /protein_id="AAC50741.1"
                     /db_xref="PID:g1620656"
                     /db_xref="GI:1620656"
                     /translation="MDLELDEYYNKTLATENNTAATRNSDFPVWDDYKSSVDDLQYFL
                     IGLYTFVSLLGFMGNLLILMALMKKRNQKTTVNFLIGNLAFSDILVVLFCSPFTLTSV
                     LLDQWMFGKVMCHIMPFLQCVSVLVSTLILISIAIVRYHMIKHPISNNLTANHGYFLI
                     ATVWTLGFAICSPLPVFHSLVELQETFGSALLSSRYLCVESWPSDSYRIAFTISLLLV
                     QYILPLVCLTVSHTSVCRSISCGLSNKENRLEENEMINLTLHPSKKSGPQVKLSGSHK
                     WSYSFIKKHRRRYSKKTACVLPAPERPSQENHSRILPENFGSVRSQLSSSSKFIPGVP
                     TCFEIKPEENSDVHELRVKRSVTRIKKRSRSVFYRLTILILVFAVSWMPLHLFHVVTD
                     FNDNLISNRHFKLVYCICHLLGMMSCCLNPILYGFLNNGIKADLVSLIHCLHM"
```

```
BASE COUNT       392 a    263 c    257 g    458 t
ORIGIN
        1 ccaagcagga ctataatatg gatttagagc tcgacgagta ttataacaag acacttgcca
       61 cagagaataa tactgctgcc actcggaatt ctgatttccc agtctgggat gactataaaa
      121 gcagtgtaga tgacttacag tattttctga ttgggctcta tacatttgta agtcttcttg
      181 gctttatggg gaatctactt attttaatgg ctctcatgaa aaagcgtaat cagaagacta
      241 cggtaaactt cctcataggc aatctggcct tttctgatat cttggttgtg ctgttttgct
      301 cacctttcac actgacgtct gtcttgctgg atcagtggat gtttggcaaa gtcatgtgcc
      361 atattatgcc ttttcttcaa tgtgtgtcag ttttggtttc aactttaatt ttaatatcaa
      421 ttgccattgt caggtatcat atgataaaac atcccatatc taataattta acagcaaacc
      481 atggctactt tctgatagct actgtctgga cactaggttt tgccatctgt tctccccttc
      541 cagtgtttca cagtcttgtg gaacttcaag aaacatttgg ttcagcattg ctgagcagca
      601 ggtatttatg tgttgagtca tggccatctg attcatacag aattgccttt actatctctt
      661 tattgctagt tcagtatatt ctgcccttag tttgtcttac tgtaagtcat acaagtgtct
      721 gcagaagtat aagctgtgga ttgtccaaca aagaaaacag acttgaagaa aatgagatga
      781 tcaacttaac tcttcatcca tccaaaaaga gtgggcctca ggtgaaactc tctggcagcc
      841 ataaatggag ttattcattc atcaaaaaac acagaagaag atatagcaag aagacagcat
      901 gtgtgttacc tgctccagaa agaccttctc aagagaacca ctccagaata cttccagaaa
      961 actttggctc tgtaagaagt cagctctctt catccagtaa gttcatacca ggggtcccca
     1021 cttgctttga gataaaacct gaagaaaatt cagatgttca tgaattgaga gtaaaacgtt
     1081 ctgttacaag aataaaaaag agatctcgaa gtgttttcta cagactgacc atactgatat
     1141 tagtatttgc tgttagttgg atgccactac accttttcca tgtggtaact gattttaatg
     1201 acaatcttat ttcaaatagg catttcaagt tggtgtattg catttgtcat ttgttgggca
     1261 tgatgtcctg ttgtcttaat ccaattctat atgggtttct taataatggg attaaagctg
     1321 atttagtgtc ccttatacac tgtcttcata tgtaataatt ctcactgttt
```

# 8. VIP

```
LOCUS       VIP          1511 bp    mRNA            PRI       19-MAR-1999
DEFINITION  Homo sapiens vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA.
ACCESSION   NM_003381
NID         g4507896
VERSION     NM_003381.1  GI:4507896
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1511)
  AUTHORS   DeLamarter,J.F., Buell,G.N., Kawashima,E., Polak,J.M. and
            Bloom,S.R.
  TITLE     Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in
            bacterial cells
  JOURNAL   Peptides 6 Suppl 1, 95-102 (1985)
  MEDLINE   86016352
COMMENT     REFSEQ: This reference sequence was derived from M36634.
            PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
            that has not yet been subject to human review. The final curated
            reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1511
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579
                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331
BASE COUNT      541 a    255 c    276 g    439 t
ORIGIN
        1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
       61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
      121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
      181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
      241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
      301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
      361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
      421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
      481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
      541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
      601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
      661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
      721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
      781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
      841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
      901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
      961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
     1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
     1081 ataaaaagac attcttccaa aaagattttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
     1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
     1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
     1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
     1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
     1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
     1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
     1501 aaaaaaaaaa a
```

## 9. VPAC1 Receptor

```
LOCUS       VIP          1511 bp    mRNA            PRI       19-MAR-1999
DEFINITION  Homo sapiens vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA.
ACCESSION   NM_003381
NID         g4507896
VERSION     NM_003381.1  GI:4507896
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1511)
  AUTHORS   DeLamarter,J.F., Buell,G.N., Kawashima,E., Polak,J.M. and
            Bloom,S.R.
  TITLE     Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in
            bacterial cells
  JOURNAL   Peptides 6 Suppl 1, 95-102 (1985)
  MEDLINE   86016352
COMMENT     REFSEQ: This reference sequence was derived from M36634.
            PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
            that has not yet been subject to human review. The final curated
            reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1511
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579
                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
```

```
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331
BASE COUNT      541 a    255 c    276 g    439 t
ORIGIN
        1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
       61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
      121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
      181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
      241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
      301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
      361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
      421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
      481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
      541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
      601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
      661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
      721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
      781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
      841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
      901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
      961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
     1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
     1081 ataaaaagac attcttccaa aaagattttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
     1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
     1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
     1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
     1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
     1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
     1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
     1501 aaaaaaaaaa a
```

## 10. VPAC2 Receptor

```
LOCUS       HUMHVRP      1640 bp    mRNA            PRI       16-FEB-1995
DEFINITION  Human helodermin-preferring VIP receptor (VIP2/PACAP receptor)
            mRNA, complete cds.
ACCESSION   L36566
NID         g550477
VERSION     L36566.1  GI:550477
KEYWORDS    PACAP receptor; VIP receptor; helodermin-preferring VIP receptor.
SOURCE      Homo sapiens cDNA to mRNA.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1640)
  AUTHORS   Svoboda,M., Tastenoy,M., Van Rampelbergh,J., Goossens,J.F., De
            Neef,P., Waelbroeck,M. and Robberecht,P.
  TITLE     Molecular cloning and functional characterisation of a human VIP
            receptor from SUP-T1 lymphoblasts
  JOURNAL   Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (3), 1617-1624 (1994)
  MEDLINE   95110300
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1640
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_line="SUP T1 lymphoblast"
                     /clone_lib="lamda ZAP II"
     sig_peptide     163..231
                     /note="putative; putative"
     CDS             163..1479
                     /note="human VIP2 receptor was previously called
                     'helodermin-preferring VIP receptor'; transmembrane
                     domains are located at positions: 637-696; 772-844;
                     880-948; 1003-1071; 1147-1209; 1243-1302.; Potential
                     glycosylation sites are located at :334-336; 424-426;
                     436-438."
                     /codon_start=1
                     /function="VIP and PACAP receptor"
                     /protein_id="AAC37569.1"
                     /db_xref="PID:g550478"
                     /db_xref="GI:550478"
                     /translation="MRTLLPPALLTCWLLAPVNSIHPECRFHLEIQEEETKCTELLRS
                     QTEKHKACSGVWDNITCWRPANVGETVTVPCPKVFSNFYSKAGNISKNCTSDGWSETF
                     PDFVDACGYSDPEDESKITFYILVKAIYTLGYSVSLMSLATGSIILCLFRKLHCTRNY
                     IHLNLFLSFILRAISVLVKDDVLYSSSGTLHCPDQPSSWVGCKLSLVFLQYCIMANFF
                     WLLVEGLYLHTLLVAMLPPRRCFLAYLLIGWGLPTVCIGAWTAARLYLEDTGCWDTND
                     HSVPWWVIRIPILISIIVNFVLFISIIRILLQKLTSPDVGGNDQSQYKRLAKSTLLLI
                     PLFGVHYMVFAVFPISISSKYQILFELCLGSFQGLVVAVLYCFLNSEVQCELKRKWRS
                     RCPTPSASRDYRVCGSSFSRNGSEGALQFHRASRAQSFLQTETSVI"
     mat_peptide     232..1476
```

```
                     /function="VIP and PACAP receptor"
BASE COUNT       315 a    512 c    461 g    352 t
ORIGIN
        1 cgggacgagg gggcggcccc cgcgctcggg gcgctcggct acagctgcgg ggcccgaggt
       61 ctccgcgcac tcgctcccgg cccatgctgg aggcggcgga acccggggga cctaggacgg
      121 aggcggcggg cgctgggcgg cccccggcac gctgagctcg ggatgcggac gctgctgcct
      181 cccgcgctgc tgacctgctg gctgctcgcc cccgtgaaca gcattcaccc agaatgccga
      241 tttcatctgg aaatacagga ggaagaaaca aaatgtacag agcttctgag gtctcaaaca
      301 gaaaaacaca aagcctgcag tggcgtctgg gacaacatca cgtgctggcg gcctgccaat
      361 gtgggagaga ccgtcacggt gccctgccca aaagtcttca gcaattttta cagcaaagca
      421 ggaaacataa gcaaaaactg tacgagtgac ggatggtcag agacgttccc agatttcgtc
      481 gatgcctgtg gctacagcga cccggaggat gagagcaaga tcacgtttta tattctggtg
      541 aaggccattt ataccctggg ctacagtgtc tctctgatgt ctcttgcaac aggaagcata
      601 attctgtgcc tcttcaggaa gctgcactgc accaggaatt acatccacct gaacctgttc
      661 ctgtccttca tcctgagagc catctcagtg ctggtcaagg acgacgttct ctactccagc
      721 tctggcacgt tgcactgccc tgaccagcca tcctcctggg tgggctgcaa gctgagcctg
      781 gtcttcctgc agtactgcat catggccaac ttcttctggc tgctggtgga ggggctctac
      841 ctccacaccc tcctggtggc catgctcccc cctagaaggt gcttcctggc ctacctcctg
      901 atcggatggg gcctccccac cgtctgcatc ggtgcatgga ctgcggccag gctctactta
      961 gaagacaccg gttgctggga tacaaacgac cacagtgtgc cctggtgggt catacgaata
     1021 ccgattttaa tttccatcat cgtcaatttt gtccttttca ttagtattat acgaattttg
     1081 ctgcagaagt taacatcccc agatgtcggc ggcaacgacc agtctcagta caagaggctg
     1141 gccaagtcca cgctcctgct tatcccgctg ttcggcgtcc actacatggt gtttgccgtg
     1201 tttcccatca gcatctcctc caaataccag atactgtttg agctgtgcct cgggtcgttc
     1261 cagggcctgg tggtggccgt cctctactgt ttcctgaaca gtgaggtgca gtgcgagctg
     1321 aagcgaaaat ggcgaagccg gtgcccgacc ccgtccgcga gccgggatta cagggtctgc
     1381 ggttcctcct tctcccacaa cggctcggag ggcgccctgc agttccaccg cgcgtcccga
     1441 gcccagtcct tcctgcaaac ggagacctcg gtcatctagc cccacccctg cctgtcggac
     1501 gcggcgggag gcccacggtt cggggcttct gcggggctga gacgccggct tcctccttcc
     1561 agatgcccga gcaccgtgtc gggcaggtca gcgcggtcct gactccgtca agctggttgt
     1621 ccactaaacc ccatacctgg
```

## ABBREVIATIONS

FSD = female sexual dysfunction
FSAD = female sexual arousal disorder

cAMP = cyclic adenosine-3',5'-monophosphate
cGMP = cyclic guanosine-3',5'-monophosphate

$P_{cAMP}$ = potentiator of cAMP
$P_{cGMP}$ = potentiator of cGMP

$A_{cAMP}$ = activator of cAMP
$A_{cGMP}$ = activator of cGMP

$AM_{cAMP}$ = adverse modulator of cAMP
$AM_{cGMP}$ = adverse modulator of cGMP

$I_{cAMP}$ = inhibitor of cAMP
$I_{cGMP}$ = inhibitor of cGMP
$I{:}I_{cAMP}$ = inhibitor of an inhibitor of cAMP
$I{:}I_{cGMP}$ = inhibitor of an inhibitor of cGMP
$I{:}AM_{cAMP}$ = inhibitor of an adverse modulator of cAMP
$I{:}AM_{cGMP}$ = inhibitor of an adverse modulator of cGMP
$U{:}A_{cAMP}$ = upregulator of activator of cAMP
$U{:}A_{cGMP}$ = upregulator of activator of cGMP

AC = adenylate cyclase
A:AC = activator of AC

NEP = neutral endopeptidase
I:NEP = inhibitor of NEP

VIP = vasoactive intestinal peptide
VIPr = receptor of VIP (may be expressed as VIPR)
$VIP_n$ = receptor sub-type of VIP (such as VIPR1, VIPR2)
A:VIPr = activator of VIPr
$A{:}VIP_n$ = activator of $VIP_n$

I:VIPr = inhibitor of VIPr
I:VIP$_n$ = inhibitor of VIP$_n$
I:I:VIPr = inhibitor of an inhibitor of VIPr
I:I:VIP$_n$ = inhibitor of an inhibitor of VIP$_n$

PDE = phosphodiesterase
PDEn = PDE family (e.g. PDE1, PDE2 etc.)
PDE$_{cAMP}$ = PDE capable of hydrolysing cAMP
PDE$_{cGMP}$ = PDE capable of hydrolysing cGMP
I:PDE$_{cAMP}$ = inhibitor of a PDE capable of hydrolysing cAMP
I:PDE$_{cAMP}$ = inhibitor of a PDE family capable of hydrolysing cAMP

NPY = neuropeptide Y
NPYr = receptor of NPY (may be expressed as NPYR)
NPY Y$_n$ = Y$_n$ receptor sub-type of NPY (e.g. NPY Y$_1$) (e.g. NPYR1)
I:NPY = inhibitor of NPY
I:NPY Y$_n$ = inhibitor of NPY Y$_n$

kDa = kilodalton
bp = base pair
kb = kilobase pair

671

## CLAIMS

1. A pharmaceutical composition for subsequent use in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

2. A pharmaceutical composition according to claim 1 wherein the agent is a mediator of vaginal vasorelaxation.

3. A pharmaceutical composition according to claim 1 or claim 2 wherein the composition is for oral administration.

4. Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

5. Use according to claim 4 wherein the agent is a mediator of vaginal vasorelaxation.

6. Use according to claim 4 or claim 5 wherein the medicament is for oral administration.

7. A method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

8. A method according to claim 7 wherein the agent is a mediator of vaginal vasorelaxation.

9. A method according to claim 7 or claim 8 wherein the agent is orally administered.

10. An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSAD.

11. A process comprising the steps of:

(a) performing the assay according to claim 10;

(b) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP; and

(c) preparing a quantity of those one or more identified agents.

12. A method of treating FSAD by potentiating *in vivo* cAMP with an agent;

wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP in an *in vitro* assay method;

wherein the *in vitro* assay method is the assay method defined in claim 10.

13. Use of an agent in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of FSAD, the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP when assayed *in vitro* by the assay method according to claim 10.

14. An agent identified by the assay method according to claim 10.

15. An agent according to claim 14 for use in medicine.

16. An agent according to claim 14 for use in treating FSAD.

17. A medicament for oral administration to treat FSAD, wherein the medicament comprises the agent according to claim 14.

18. A diagnostic method, the method comprising isolating a sample from a female; determining whether the sample contains an entity present in such an amount to cause FSAD or is in an amount so as to cause FSAD; wherein the entity has a direct or indirect effect on the level or activity of cAMP in the sexual genitalia of the female.

19. A diagnostic composition or kit comprising means for detecting an entity in an isolated female sample; wherein the means can be used to determine whether the sample contains the entity and in such an amount to cause FSAD or is in an amount so as to cause FSAD; wherein the entity has a direct or indirect effect on the level or activity of cAMP in the sexual genitalia of the female.

20. An animal model used to identify agents capable of treating FSAD, said model comprising an anaesthetised female animal including means to measure changes in vaginal blood flow of said animal following stimulation of the pelvic nerve thereof.

21. An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSAD, the assay method comprising: administering an agent to the animal model of claim 20; and measuring any potentiation of cAMP and/or increase in blood flow in the vagina of said animal.

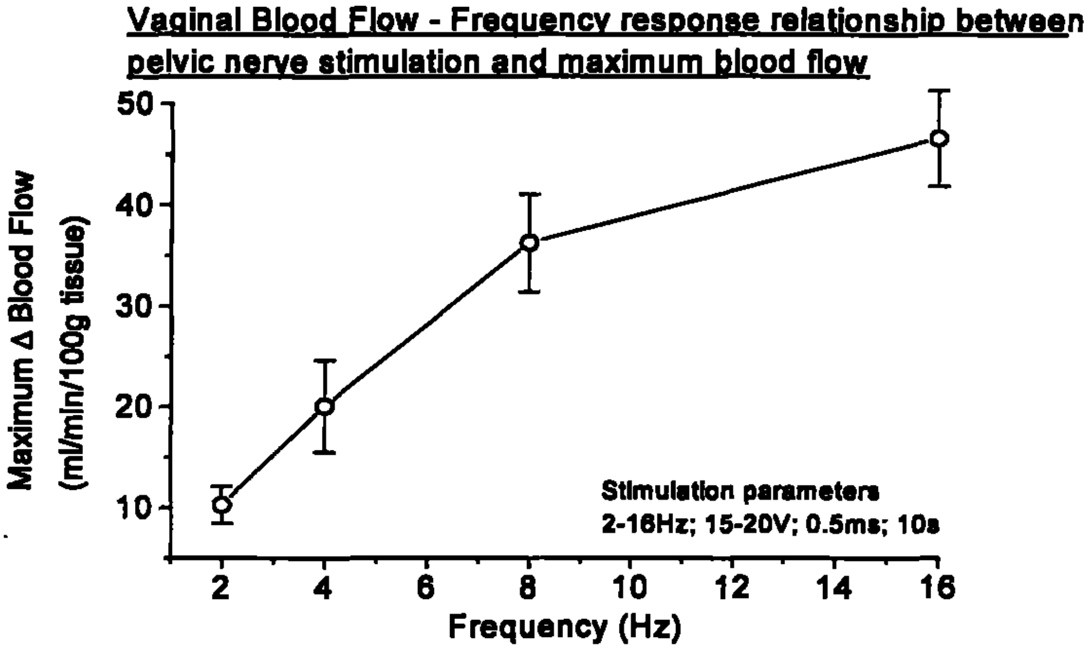
22. An agent identified by the assay method according to claim 21.

# ABSTRACT

## PHARMACEUTICAL

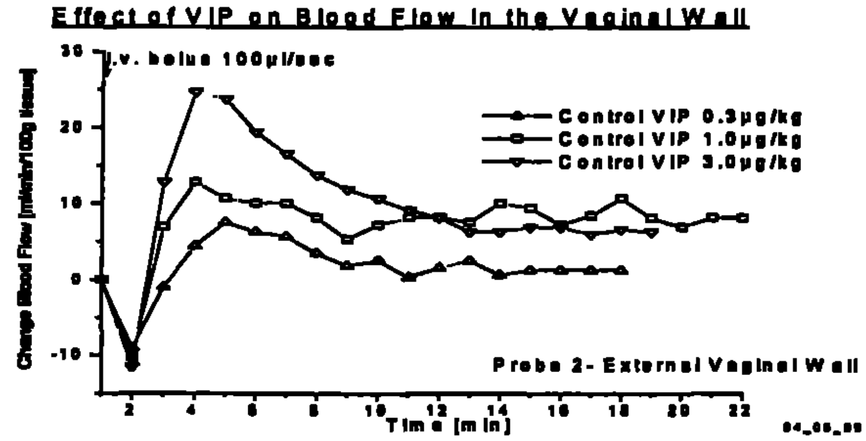
A method of treating a female suffering from FSAD is described. The method comprises delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female. The agent may be admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

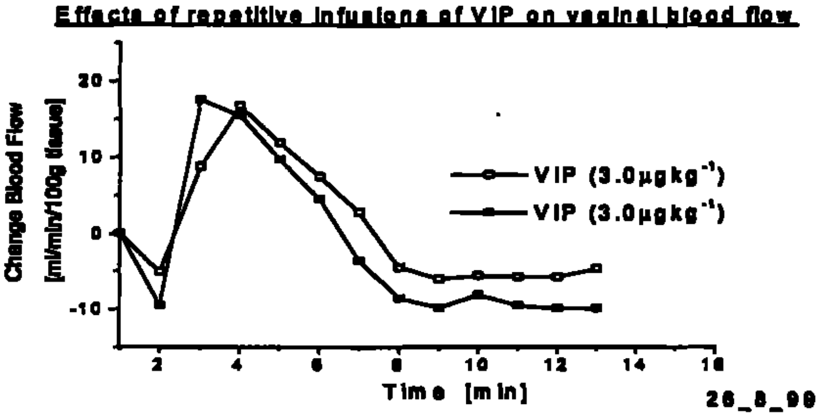
Figure 1


Vaginal Blood Flow - Frequency response relationship between pelvic nerve stimulation and maximum blood flow
Maximum Δ Blood Flow
(ml/min/100g tissue)
50
40
30
20
10
Stimulation parameters
2-16Hz; 15-20V; 0.5ms; 10s
2
4
6
8
10
12
14
16
Frequency (Hz)

674

Figure 2

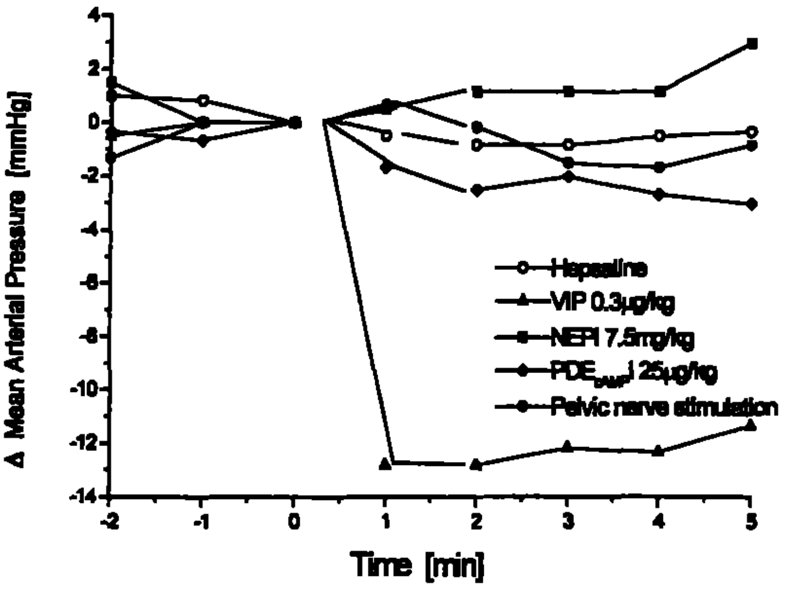

Effect of VIP on Blood Flow in the Vaginal Wall


Effects of repetitive infusions of VIP on vaginal blood flow

675

Figure 3

Effect of VIP, an NEP Inhibitor, a PDE$_{cAMP}$ inhibitor or Pelvic Nerve Stimulation on Mean Arterial Pressure in the Anaesthetised Rabbit

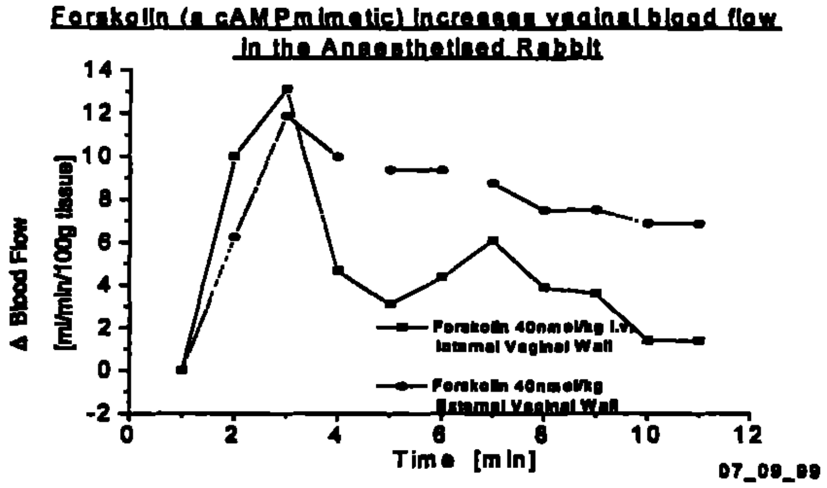


22_10_99

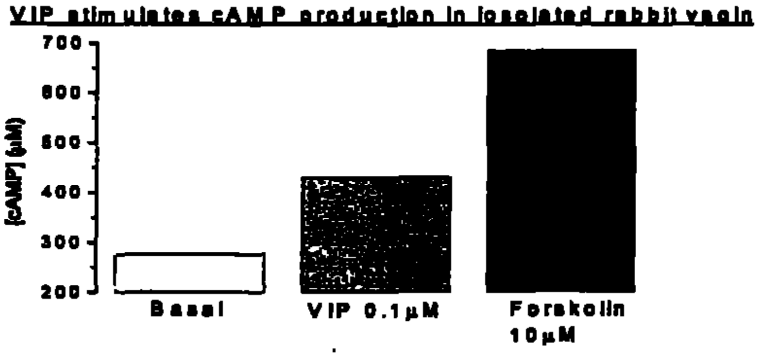
6/6

Figure 4

4a

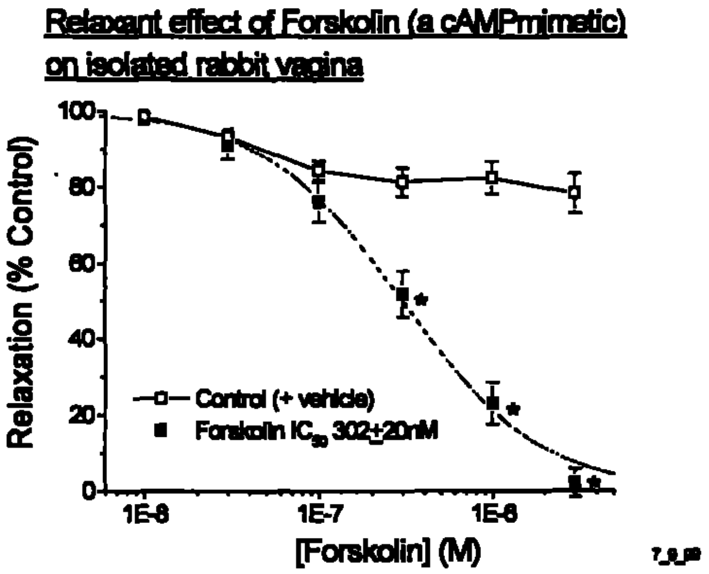


)



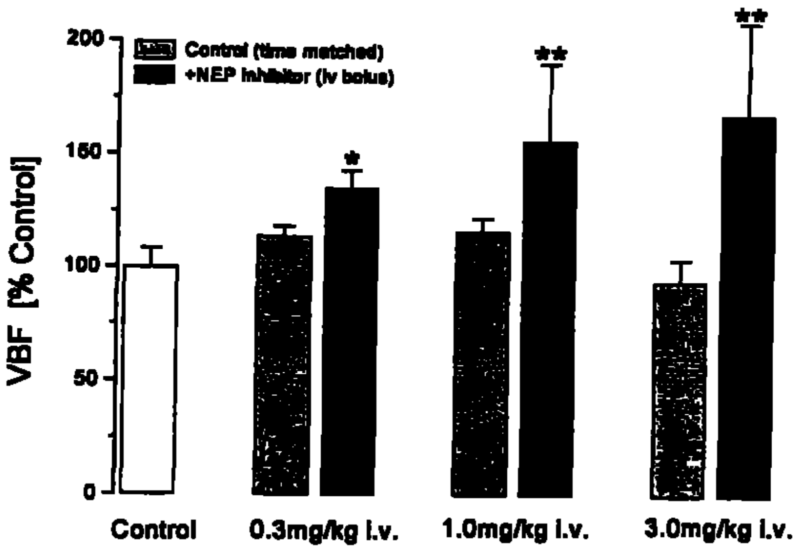
4b)

5



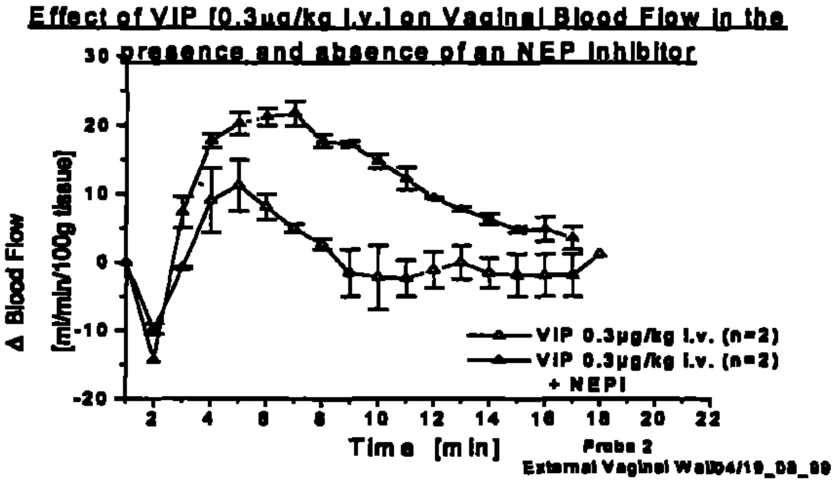
4c)

Figure 5

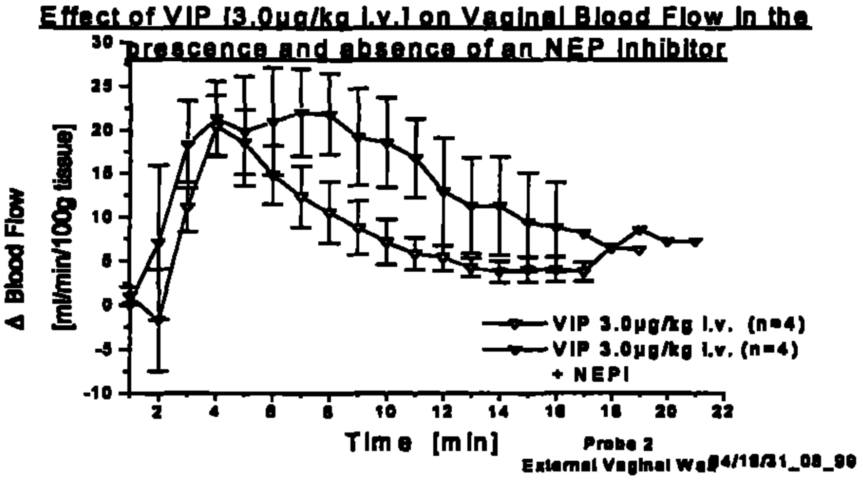


n=3; * P>0.01,** P>0.001, Student's paired t-test

Figure 6

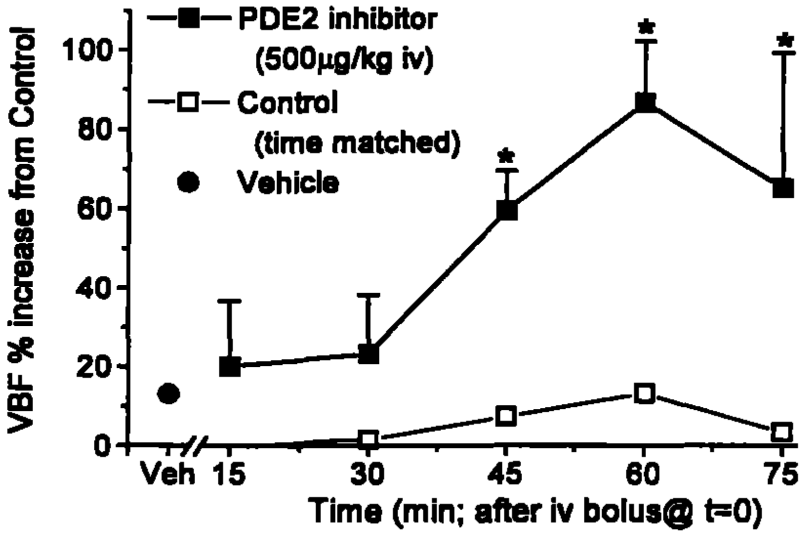


Effect of VIP [0.3µg/kg i.v.] on Vaginal Blood Flow in the presence and absence of an NEP inhibitor



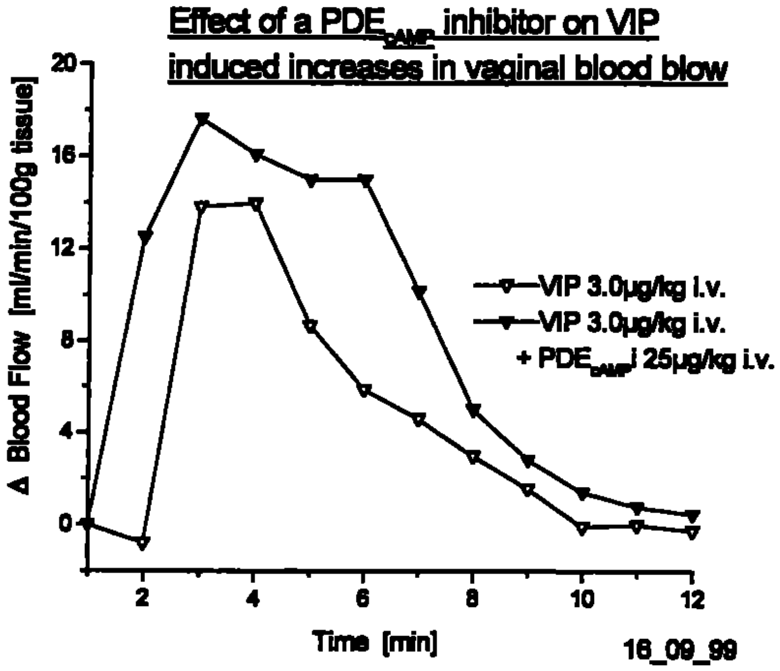
Effect of VIP [3.0µg/kg i.v.] on Vaginal Blood Flow in the prescence and absence of an NEP inhibitor

Figure 7



* P>0.01 Student's paired t-test

Figure 8


Effect of a PDE$_{cAMP}$ inhibitor on VIP induced increases in vaginal blood blow
Δ Blood Flow [ml/min/100g tissue]
20
16
12
8
4
0
2
4
6
8
10
12
Time [min]
VIP 3.0µg/kg i.v.
VIP 3.0µg/kg i.v. + PDE$_{cAMP}$i 25µg/kg i.v.
16_09_99

PATENTES [illegible] MORENO
ING [illegible] MAN
[illegible] 3
[illegible] RID
Telé. [illegible]

## OFICINA DE PATENTES

Oficina de Patentes
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

El abajo firmante, siendo funcionario debidamente autorizado de acuerdo con la Sección 74(1) y (4) de la Ley de 1994 de Regulación y Contratación exterior, para firmar y expedir certificados por cuenta del Interventor General, certificó que, adjunto al presente documento se encuentra una copia exacta de los documentos presentados originalmente con relación a la solicitud de Patente identificada aquí.

Si, de acuerdo con las Normas de Patentes de 1.982 (Re-registro de Compañías) una compañía nombrada en el presente certificado y en cualesquiera documentos que lo acompañan ha sido re-registrada al amparo de la Ley de Sociedades de 1.980 con el mismo nombre con el cual había sido registrada inmediatamente antes de su re-registro salvo la sustitución, o la inclusión, como última parte del nombre, de las palabras "sociedad de responsabilidad limitada" o sus equivalentes en Galés, las referencias al nombre de la compañía en este certificado y en cualesquiera documentos que le acompañan deberán ser tratados como referencias al nombre con el cual esté re-registrada.

De acuerdo con las reglas, las palabras "sociedad-a responsabilidad limitada" pueden ser sustituidas por p.l.c., plc. P.L.C. o PLC.

El re-registro bajo la Ley de Sociedades no constituye una nueva entidad legal sino que somete simplemente la sociedad a ciertas normas adicionales de la Ley de sociedades.

Firmado: ilegible

Fecha: 1 agosto 2000

Agencia Ejecutiva del Ministerio de Comercio e Industria

682

177

IMPRESO 1/77
Ley de Patentes 1977
(Regla 16)

## OFICINA DE PATENTES

**Solicitud de concesión de una patente**
**(ver las notas por detrás de este impreso.**
**También puede conseguir un folleto explicatorio**
**de la Oficina de Patentes para rellenar este impreso)**

**Oficina de Patentes**
**Cardiff Road**
**Newport**
**Gwent NP9 1RH**

---

1. Su referencia P007553GBP CTH

---

2. Solicitud de patente número 0013001.3 26 MAYO 2000
(La Oficina de Patentes rellenará este apartado)

---

3. Nombre completo, dirección y código postal del solicitante o solicitantes (subrayar los apellidos)

Pfizer Limited
Ramsgate Road
Sandwich
Kent
CT13 9NJ

Número de ADP (si se conoce) 00001271001

Si el solicitante el una empresa, indicar el país/estado de su incorporación REINO UNIDO

---

4. Título de la invención PRODUCTO FARMACÉUTICO

---

5. Nombre de su agente (si lo tiene)

"Dirección" en el Reino Unido donde debería enviarse toda la correspondencia. (incluyendo el códico postal)

D. YOUNG & CO
21 NEW FETTER LANE
LONDON
EC4A 1DA

Número de ADP (si lo conoce) 59006

---

6. Si va a declarar prioridad por una o más solicitudes de patentes anteriores, indice el país y la fecha de solicitud de cada una de las solicitudes anteriores (si lo conoce) y el número de solicitud de las mismas 1° 2° 3°

**País** **número de solicitud de prioridad (si lo conoce)** **Fecha (día/mes/año)**

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL[illegible] Y [illegible]AN
MADRID
Teléf. [illegible]

7. Si esta solicitud es una divisional o derivada de una solicitud británica anterior, indicar el número y fecha de la solicitud anterior

| Número de la solicitud anterior | Fecha de solicitud |
|---|---|
| | |

8. ¿Se requiere una declaración de inventor y de derecho de concesión de una patente para mantener esta petición? (responder si en caso: SI
   a) algún solicitante nombrado en el apartado 3 no es un inventor, o
   b) hay un inventor quien es nombrado como un solicitante, o
   c) algún solicitante nombrado es una empresa
   Ver nota (d)

9. Poner el número de páginas para cada uno de los siguientes requisitos que está solicitando en este impreso.
   No contar copias del mismo documento

Hojas de continuación de este impreso

| | |
|---|---|
| Descripción | 171 |
| Reivindicaciones | 4 |
| Resumen | 1 |
| Dibujos | 10 + 10 |

10. Si también está solicitando alguna de las siguientes, declare cuantos de cada requisito.

| | |
|---|---|
| Documentos de Prioridad | 0 |
| Traducción de los Documentos de Prioridad | 0 |
| Declaración de los inventores y derecho de concesión de una patente (impreso de patente 1/77) | 0 |
| Solicitud de examen preliminar y búsqueda (impreso de patente 1/77) | 0 |
| Solicitud de examen substantivo (impreso de patente 1/77) | 0 |
| Otros documentos (especificar) | 0 |

11. Solicitamos la concesión de una patente basada ne esta solicitud
Firma Ilegible Fecha 26 de mayo 2000
D YOUNG & CO
Agentes de los solicitantes

MORENO
MADRID

---

12. Nombre y número de teléfono de la persona de contacto en el Reino Unido | Charles Harding 023 80634816

---

**Advertencia**
Despues de haber sido presentada una solicitud de Patente, el Interventor de la Oficina de Patentes estudiará si la publicación o la comunicación de la invención ha de ser prohibida o restringida de acuerdo con la Sección 22 de la Ley de Patentes de 1.997, y dará a conocer al solicitante si esta prohibición o esta restricción es necesaria. Se recuerda igualmente a los solicitantes que residen en el Reino Unido que las solicitudes no pueden ser presentadas fuera del país sin autorización escrita a no ser que una solicitud haya sido presentada en un plazo no inferior a 6 semanas, anteriormente, en el Reino Unido para una patente relacionada con la misma invención y si no se les ha dado ninguna instrucción prohibiendo la publicación o la comunicación o la revocación de esta instrucción.

**Notas**
a) Si usted necesita ayuda para rellenar este impreso o tiene alguna pregunta, por favor póngase en contacto con la Oficina de Patentes en 0645 500505
b) Sírvanse escribir a máquina, o con tinta negra utilizando letras mayúsculas. Una
c) Si no hay suficiente espacio para todos los detalles pertinentes en cualquier apartado de este impreso, por favor continúe en hoja aparte y escriba "ver hoja complementaria" en la parte(s) pertinente. Cualquier hoja complementaria debería adjuntarse a este impreso.
d) Si usted ha contestado "Si" necesitará rellenar el impreso de patente 7/77.
f) Para los detalles de la tasa y forma de pago, sírvanse consultar la Oficina de Patentes

**Impreso de Patentes 1/77**

PATRICIA ... MORENO
... MADRID

GB 0013001.3 solicitda el 26 de mayo de 2000

# PRODUCTO FARMACEUTICO

## AMBITO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un producto farmacéutico que es útil para el tratamiento de la disfunción sexual femenina (FSD), en particular de trastornos de la excitación sexual femenina (FSAD).

La presente invención se refiere también a un procedimiento de tratamiento de la FSD, en particular de los FSAD.

La presente invención se refiere también a ensayos para rastrear compuestos útiles en el tratamiento de la FSD, en particular de los FSAD.

Por conveniencia, se presenta una lista de las abreviaturas que se utilizan en el siguiente texto antes de la sección de reivindicaciones.

## RESPUESTA SEXUAL FEMENINA

La fase de excitación de la respuesta sexual femenina no se distingue fácilmente de la fase de deseo hasta que empiezan a tener lugar cambios fisiológicos en la vagina y clítoris así como en otros órganos sexuales. La excitación y placer sexuales están acompañados de una

combinación de eventos vasculares y neuromusculares que conducen a la congestión del clítoris, labios y pared vaginal, a un aumento de la lubricación vaginal y de la dilatación del lumen vaginal (Levin, 1980, Ottesen, 1983, Levin, 1991, Levin, 1992, Sjoberg, 1992, Wagner, 1992, Schiavi et al., 1995, Masters et al., 1996, Berman et al., 1999).

La congestión vaginal posibilita que tenga lugar la trasudación, y este proceso es responsable del aumento de la lubricación vaginal. La trasudación permite un flujo de plasma a través del epitelio sobre la superficie de la vagina, cuya fuerza motriz es el aumento del flujo sanguíneo en el lecho capilar vaginal durante el estado excitado. Además, la congestión conduce a un aumento de la longitud vaginal y del diámetro luminal, especialmente en los dos tercios distales del canal vaginal. La dilatación luminal de la vagina se debe a una combinación de la relajación del músculo liso de esta pared y la relajación del músculo esquelético de los músculos del suelo pélvico. Algunos trastornos de dolor sexual, como el vaginismo, se piensa que son debidos, al menos en parte, a una inadecuada relajación que evita la dilatación de la vagina, todavía debe determinarse si este es un problema principalmente del músculo liso o del esquelético. (Levin, 1980, Ottesen,

[illegible] MORENO [illegible] AN [illegible] Y [illegible] RID

1983, Levin, 1991, Sjoberg, 1992, Wagner, 1992, Schiavi et al., 1995, Master et al., 1996, Berman et al., 1999).

La vasculatura y microvasculatura de la vagina están inervadas por nervios que contienen neuropéptidos y otros candidatos a neurotransmisores. Estos incluyen el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), el neuropéptido Y (NPY), la óxido nítrico sintasa (NOS), la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), (Hoyle et al., 1996). Los péptidos que están presentes en el clítoris se discuten a continuación. La óxido nítrico sintasa, que se localiza a menudo con el VIP, muestra una mayor expresión, inmunológicamente, en las arterias y venas profundas que en los vasos sanguíneos propios (Hoyle et al., 1996).

## DISFUNCION SEXUAL FEMENINA

Se sabe que algunos individuos pueden sufrir disfunción sexual femenina (FSD).

La FSD se define como la dificultad o incapacidad de una mujer para encontrar satisfación en la expresión sexual. La FSD es un término colectivo para varios trastornos sexuales femeninos (Leiblum, 1998, Berman et al., 1999). La mujer puede tener falta de deseo, dificultad con la

PATRICIA [illegible] MORENO

excitación o el orgasmo, dolor en el coito o una combinación de estos problemas. Algunos tipos de enfermedades, medicaciones, heridas o problemas psicológicos pueden producir la FSD. Los tratamientos en desarrollo están dirigidos a tratar tipos específicos de la FSD, predominantemente los trastornos de deseo y excitación.

Las categorías de la FSD se definen mejor por contraste con las fases de la respuesta sexual femenina normal: deseo, excitación y orgasmo (Leiblum, 1998). El deseo o líbido es el motor de la expresión sexual, y sus manifestaciones incluyen a menudo pensamientos sexuales junto con un compañero interesado o al exponerse a otros estímulos eróticos. En contraposición, la excitación sexual es la respuesta vascular a la estimulación sexual, un componente importante de la cual es la lubricación vaginal y la elongación de la vagina. De esta manera, la excitación sexual en contraposición al deseo sexual, es una respuesta relativa al flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal) y no necesariamente a la sensibilidad. El orgasmo es la liberación de la tensión sexual que ha culminado durante la excitación.

Por ello, la FSD aparece típicamente cuando una mujer tiene una respuesta inadecuada o insatisfactoria en cualquiera de estas fases, habitualmente deseo, excitación u orgasmo. Las categorías de la FSD incluyen: trastorno del deseo sexual hipoactivo, trastorno de la excitación sexual, trastornos orgásmicos y trastornos de dolor sexual.

El trastorno del deseo sexual hipoactivo está presente si una mujer no tiene deseo, o tiene poco, de ser sexual, y no tiene pensamientos o fantasías sexuales, o tiene pocos. Este tipo de la FSD puede producirse por niveles bajos de testosterona, debidos a la menopausia natural o a la menopausia quirúrgica. Otras causas incluyen enfermedad, medicaciones, fatiga, depresión y ansiedad.

El trastorno de la excitación sexual (FSAD) se caracteriza por una respuesta genital inadecuada a la estimulación sexual. Los genitales no experimentan la congestión que caracteriza a la excitación sexual normal. Las paredes vaginales están poco lubricadas, de modo que el coito es doloroso. Los orgasmos pueden estar imposibilitados. El trastorno de la excitación puede estar producido por una reducción de estrógenos en la menopausia o después de un parto y durante la lactancia, así como por enfermedad, con componentes vasculares como diabetes y aterosclerosis. Otras causas son resultado del tratamiento con agentes diuréticos, antihistamínicos, antidepresivos, por ejemplo SSRI, o antihipertensivos.

Los trastornos de dolor sexual (que incluyen dispareunia y vaginismo) se caracterizan por dolor como resultado de la penetración y pueden estar causados por medicaciones que reducen la lubricación, endometriosis, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad intestinal inflamatoria o problemas del tracto urinario.

La prevalencia de la FSD es difícil de calibrar debido a que el término cubre varios tipos de problemas, algunos de los cuales son difíciles de medir, y debido a que el interés por tratar la FSD es relativamente reciente. Muchos problemas sexuales de las mujeres están asociados directamente al proceso de envejecimiento femenino o a enfermedades crónicas como diabetes e hipertensión.

Existen amplias variaciones en la incidencia y prevalencia de la FSD descritas, explicadas en parte por el uso de criterios de evaluación diferentes, pero la mayoría de los investigadores comunica que una proporción significativa de mujeres por lo demás sanas tiene síntomas de uno o más de los subgrupos FSD.

PATRICIA [illegible] MORENO

Como ejemplo, los estudios que comparan la disfunción sexual en parejas revelan que el 63% de las mujeres tienen disfunción de la excitación o del orgasmo, comparado con el 40% de los hombres que tienen disfunción eréctil o eyaculatoria (Frank et al., 1978).

Sin embargo, la prevalencia del trastorno de la excitación sexual femenina varía considerablemente de estudio a estudio. En un reciente estudio de National Health and Social Life, el 19% de las mujeres comunicaron dificultades de lubricación, mientras que el 14% de las mujeres pacientes ambulatorias de una clínica ginecológica comunicaron dificultades similares con la lubricación (Rosen et al., 1993).

Varios estudios han informado también acerca de disfunción de la excitación sexual en mujeres diabéticas (hasta un 47%), incluyendo la reducción de la lubricación vaginal (Wincze et al., 1993). No hubo asociación entre neuropatía y disfunción sexual.

Numerosos estudios han mostrado también que entre un 11-48% de mujeres en conjunto pueden tener un deseo sexual reducido con la edad. De forma similar, entre 11-50% de las mujeres comunican problemas con la excitación y la

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

lubricación, y por lo tanto experimentan dolor en el coito. El vaginismo es menos común, afectando aproximadamente al 1% de las mujeres.

Los estudios de mujeres sexualmente experimentadas han detallado que el 5-10% tienen anorgasmia primaria. Otro 10% tiene orgasmos infrecuentes y otro 10% los experimenta inconsistentemente (Spector et al., 1990).

Debido a que la FSD consiste en varios subtipos que expresan síntomas en fases separadas del ciclo de respuesta sexual, no hay una terapia única. El tratamiento actual de la FSD se enfoca principalmente a temas psicológicos y de relación. El tratamiento de la FSD evoluciona gradualmente según se dedican más estudios clínicos y de ciencia básica a la investigación de este problema médico. Las dolencias sexuales femeninas no son todas psicológicas en su patofisiología, especialmente para aquellos individuos que pueden tener un componente de disfunción vasculogénica (por ejemplo FSAD) que contribuye a la dolencia sexual femenina en conjunto. No existen actualmente fármacos autorizados para el tratamiento de la FSD. La terapia de medicamentos empírica incluye la administración de estrógenos (tópicamente o en forma de una terapia de sustitución hormonal), andrógenos o medicamentos de alteración del

PATRICIA MORENO

ánimo como buspirona o trazodona. Estas opciones de tratamiento a menudo son insatisfactorias debido a la baja eficacia o a efectos secundarios inaceptables.

Puesto que el interés en tratar la FSD farmacológicamente es relativamente reciente, la terapia consiste en los siguiente: consejo psicológico, lubricantes sexuales sin receta médica y candidatos investigacionales, incluyendo medicamentos aprobados para otras dolencias. Estos medicamentos consisten en agentes hormonales, testosterona o combinaciones de estrógeno y testosterona, y más recientemente, medicamentos vasculares que se han mostrado eficaces en la disfunción eréctil masculina. Ninguno de estos agentes ha demostrado ser muy eficaz para tratar la FSD.

## TRASTORNO DE LA EXCITACION SEXUAL FEMENINA (FSAD)

El manual de diagnóstico y estadística (DSM) IV de la Asociación Psiquiátrica Americana define el trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) como:

> "*una incapacidad persistente o recurrente para alcanzar o mantener hasta la terminación de la actividad sexual una respuesta adecuada de*

*lubricación-tumefacción de la excitación sexual. La alteración produce una notable tensión o dificultades interpersonales."*

La respuesta de excitación consiste en vasocongestión de la pelvis, lubricación vaginal y expansión y tumefacción de los genitales externos. La alteración produce una notable tensión y/o dificultades interpersonales. Los estudios que investigan la disfunción sexual en parejas revelan que el 63% de las mujeres tienen disfunción de la excitación o del orgasmo.

El FSAD es un trastorno sexual altamente prevalente que afecta a mujeres pre-, peri- y postmenopáusicas (±HRT). Está asociado a trastornos concomitantes como depresión, enfermedades cardiovasculares, diabetes y trastornos UG.

Las consecuencias primarias del FSAD son la falta de congestión/tumefacción, falta de lubricación y falta de sensación genital placentera. Las consecuencias secundarias del FSAD son una reducción del deseo sexual, dolor durante el coito y dificultades para conseguir un orgasmo.

Recientemente se ha hipotetizado que existe una base vascular para al menos una parte de las pacientes con síntomas del FSAD (Goldstein et al., 1998) con datos animales que apoyan esta perspectiva (Park et al., 1997).

Los medicamentos candidatos para el tratamiento del FSAD, en los que se está investigando su eficacia, son principalmente terapias de disfunción eréctil que potencian la circulación en los genitales masculinos. Consisten en dos tipos de formulación: medicación oral o sublingual (apomorfina, fentolamina, sildenafilo) y prostaglandina ($PGE_1$) que se inyecta o administra transuretralmente en hombres, y tópicamente en los genitales de las mujeres.

La presente invención trata de proporcionar un medio eficaz de tratamiento de la FSD.

ASPECTOS DEL SUMARIO DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se basa en los descubrimientos según los cuales el FSAD está asociado a una reducción del flujo sanguíneo genital. El tratamiento de mujeres con FSAD puede llevarse a cabo por estimulación del flujo sanguíneo genital con agentes vasoactivos. Los presentes autores han mostrado claramente que el cAMP media en la vasorrelajación vaginal y que el flujo sanguíneo vaginal puede estimularse/potenciarse por elevación de los niveles de

PATRICIA [illegible] MORENO
INC

cAMP. Este es el descubrimiento base.

A este respecto, nadie ha propuesto anteriormente que el FSAD pueda tratarse de tal manera, es decir, elevación directa o indirecta de los niveles de cAMP. Además, no hay explicaciones en la técnica que sugieran que el FSAD estaba asociado a una modulación perjudicial de la actividad y/o niveles de cAMP o que el cAMP es responsable de la mediación en la vasorrelajación vaginal. Por ello, la presente invención es sorprendente.

Además, se ha encontrado que utilizando los agentes de la presente invención es tratar el FSAD aumentando la lubricación en la vagina y, opcionalmente, en el clítoris.

Por ello, en un aspecto amplio, la presente invención se refiere al uso de un potenciador de cAMP para tratar la FSD, en particular el FSAD.

La presente invención es ventajosa porque proporciona un medio para restablecer una respuesta de excitación sexual normal, es decir, un aumento del flujo sanguíneo genital que conduce a la congestión vaginal y labial. Esto resultará en un aumento de la lubricación vaginal por trasudación de plasma, un aumento de la flexibilidad vaginal y un aumento de la sensibilidad vaginal. Por ello, la presente invención proporciona un medio para restablecer, o imitar, la respuesta de excitación sexual normal.

## ASPECTOS DETALLADOS DE LA PRESENTE INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una mujer que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En este caso, la composición (como cualquiera de las demás composiciones mencionadas en la presente) puede estar envasada para uso posterior en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, siendo capaz el agente de potenciar cAMP en los genitales de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD.

[illegible] MORENO
ING. [illegible]
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la mujer, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto un agente con cAMP, y medir la actividad de cAMP, siendo una potenciación del cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de: (a) realizar el ensayo según la presente invención, (b) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente la actividad de cAMP y (c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados.

En este aspecto, el agente identificado en la etapa (b) puede modificarse de modo que, por ejemplo, se maximice la actividad y después puede repetirse la etapa (a). Estas etapas pueden repetirse hasta que se alcance la actividad o perfil farmacocinético deseado.

Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de (a1) realizar el ensayo según la presente invención, (b1) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente la actividad de cAMP, (b2) modificar uno o más de los citados gentes identificados, (a2) repetir opcionalmente la etapa (a1) y (c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de la FSD, en particular FSAD, por potenciación in vivo de cAMP con un agente, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP en un procedimiento de ensayo in vitro, siendo el procedimiento de ensayo in vitro el procedimiento de ensayo según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP al ensayarlo in vitro mediante el procedimiento de ensayo según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un modelo animal utilizado para identificar agentes capaces de tratar FSD (en particular FSAD), comprendiendo el citado modelo un animal hembra anestesiado incluyendo los medios para medir cambios en el flujo sanguíneo vaginal del citado animal después de la estimulación del nervio pélvico de éste.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: administrar un agente al modelo animal de la presente invención y medir cualquier potenciación de cAMP y/o cualquier aumento del flujo sanguíneo en la vagina del citado animal.

Para facilitar la referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se discuten ahora en los encabezados de sección apropiados. Sin embargo, las explicaciones de cada sección no están limitadas necesariamente a cada sección

MORENO
MAN
13
DRID

particular.

ASPECTOS PREFERIDOS

Preferiblemente el agente es para el tratamiento de los FSAD.

Preferiblemente el agente es un mediador de la vasorrelajación vaginal.

En una realización, el agente es preferiblemente para administración oral.

En otra realización, el agente puede ser para administración tópica.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un efecto potenciador sobre cAMP. Expresado como alternativa, para algunas aplicaciones el agente no tiene preferiblemente un efecto potenciador directo sobre cAMP. Un ejemplo de agente que tiene un efecto potenciador directo es VIP administrado exógenamente. Sin embargo, se comprende que, en este aspecto preferido, el agente puede tener un efecto potenciador indirecto sobre cAMP al actuar sobre los agentes de actuación directa de origen y localización natural, como los VIP de origen y localización natural.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un inhibidor, es decir, es capaz de exhibir una función inhibidora.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:PDE (a veces escrito como PDEi), más preferiblemente un I:PDEII (a veces escrito como I:PDE2 o PDEIIi o PDE2i).

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NEP (a veces escrito como NEPi).

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NPY (a veces escrito como NPYi).

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:PDEII selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NEP selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NPY selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente preferiblemente no produce, o es administrado de forma que no la produzca, una caída prolongada de la presión sanguínea (por ejemplo durante un periodo de alrededor de 5 minutos o más). En esta realización, si el agente se administra tópicamente, entonces dicho agente puede tener la capacidad de producir una caída de la presión sanguínea (como si se suministrase por vía intravenosa), siempre que en la aplicación tópica pasen unos niveles mínimos de agente al torrente sanguíneo. Para un agente oral se prefiere que el agente no produzca una caída prolongada de la presión sanguínea.

En un aspecto preferido el agente no produce, o es administrado de forma que no produzca, un gran cambio en el ritmo cardiaco.

## TRATAMIENTO

Se apreciará que todas las referencias al tratamiento en la presente incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

## cAMP ENDOGENO

En una realización altamente preferida, el agente de la presente invención potencia el cAMP endógeno, de modo que potencia los niveles de cAMP endógeno.

En este caso, el término "cAMP endógeno" significa cAMP que se origina por la estimulación sexual (excitación sexual). Por ello, el término no comprende los niveles de cAMP que sean elevados independientemente del impulso sexual.

De esta manera, el tratamiento de FSAD según la presente invención, consiste en potenciar directa o indirectamente la señalización de cAMP endógeno, potenciando así la respuesta excitatoria sexual natural y, opcionalmente, el flujo sanguíneo vaginal/lubricación. Esto puede conseguirse mediante el uso de un inhibidor de NEP (EC 3.4.24.11) o un inhibidor de PDE hidrolizante de cAMP o un antagonista del receptor de NPY. De esta manera, el procedimiento de tratamiento de la presente invención restablece o imita la respuesta excitatoria normal.

## ESTIMULACION SEXUAL

La presente invención comprende también la administración del agente de la presente invención antes y/o durante la estimulación sexual. En este caso el término "estimulación sexual" puede ser sinónimo del término "excitación sexual".

[illegible] MORENO
ING[illegible] MAN
[illegible] 13
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

705

Este aspecto de la presente invención es ventajoso porque proporciona selectividad sistémica. La cascada natural aparece sólo en los genitales y no en otras localizaciones, por ejemplo en el corazón, etc. Por ello sería posible conseguir un efecto selectivo sobre los genitales.

De esta manera, para algunos aspectos de la presente invención es altamente deseable que exista una etapa de estimulación sexual. Se ha encontrado que esta etapa puede proporcionar selectividad sistémica. En este caso, "estimulación sexual" puede ser una o más de: estimulación visual, estimulación física, estimulación auditiva o estimulación de pensamiento.

De esta manera, los agentes de la presente invención se suministran antes o durante la estimulación sexual, particularmente cuando dichos agentes son de administración oral.

Por ello, para este aspecto preferido, la presente invención proporciona el uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración

[illegible] MORENO
ING. [illegible]
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

706

del citado medicamento.

Preferiblemente, la presente invención proporciona el uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado medicamento y siendo suministrado el citado medicamento oralmente a la citada hembra.

Además, para este aspecto preferido, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado agente.

Preferiblemente la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD,

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
C [illegible] 113
MADRID
Telf. [illegible]

comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado agente, y siendo suministrado el citado agente oralmente a la citada hembra.

## POTENCIACION de cAMP

Como se utiliza en la presente con referencia al cAMP, el término "potenciación" incluye cualquiera de: aumento de la eficacia de cAMP, aumento de los niveles de cAMP, aumento de la actividad de cAMP, reducción del nivel de la degradación de cAMP, reducción del nivel de inhibición de cAMP.

El efecto potenciador puede ser un efecto directo. Un ejemplo de efecto directo sería la sobrerregulación de los niveles de cAMP por un agente que aumenta la expresión de éste.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMAN
[illegible] MADRID
Tel.

Como alternativa, el efecto potenciador podría ser un efecto indirecto. Un ejemplo de dicho efecto sería la acción sobre una sustancia que, de otra manera, inhibiría y/o reduciría los niveles y/o actividad de cAMP. Otro ejemplo de dicho efecto sería el aumento de la acción de una sustancia que aumenta la eficacia de cAMP, aumenta los niveles de cAMP, aumenta la actividad de CAMP, reduce el nivel de degradación de cAMP o reduce el nivel de inhibición de cAMP.

Como alternativa, el agente puede actuar incluso como un mimético de cAMP.

## Miméticos de cAMP

Como se utiliza en la presente, el término "mimético de cAMP" significa un agente que puede actuar de modo similar (por ejemplo, tener un perfil y efecto bilógicos similares) al cAMP en los genitales sexuales femeninos, y hacerlo mediante uno o más de: aumento de la eficacia de los restos similares a cAMP, aumento de los niveles de los restos similares a cAMP, aumento de la actividad de los restos similares a cAMP, reducción del nivel de degradación de los restos similares a cAMP, reducción del nivel de inhibición de los restos similares a cAMP.

PATRICIA [illegible] MORENO
ING [illegible] AN
[illegible] 13
[illegible] RID
Telf. [illegible]

De esta manera, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de los FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

De esta manera, en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para el tratamiento de los FSAD, siendo el agente capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

De esta manera, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente en una cantidad que potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

PATRICIA [illegible] MORENO
ING[illegible] [illegible] JAN
C [illegible] 13
Telef. [illegible] MADRID

Un ejemplo de mimético de cAMP sería la forscolina. Hemos encontrado que la forscolina aumenta el flujo sanguíneo vaginal y puede actuar también como relajante vaginal.

En un aspecto preferido, el mimético de cAMP se administra oralmente.

ACTIVADOR DE cAMP

Como se utiliza en la presente, el término "activador de cAMP" significa una sustancia que controla o libera cAMP en los genitales sexuales femeninos. El control puede ser directo o indirecto. Para facilitar la referencia se hace referencia a estas sustancias como $A_{cAMP}$.

DIANA

El término "diana" como se utiliza en la presente con referencia a la presente invención significa cualquier sustancia que sea cAMP, un $A_{cAMP}$, un $I_{cAMP}$ o un $AM_{cAMP}$. Expresado de otra manera, la diana puede referirse como una diana $P_{cAMP}$.

La diana del agente de la presente invención puede ser una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos

PAT[illegible] MORENO
INO[illegible] MAN
C[illegible] 13
Telf. 5[illegible] MADRID

que codifica la misma y/o una unidad de expresión responsable de la expresión de la misma y/o un modulador de la misma.

La diana puede ser incluso una combinación de dichas dianas.

AGENTE

El agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como una $P_{cAMP}$.

El agente puede ser una secuencia de aminoácidos o un derivado químico de ésta. La sustancia puede ser incluso un compuesto orgánico u otro compuesto químico. El agente puede incluso ser una secuencia de nucleótidos, que puede ser una secuencia con sentido o una secuencia sin sentido. El agente puede ser incluso un anticuerpo.

De esta manera, el término "agente" incluye, aunque no está limitado a él, un compuesto que puede obtenerse o producirse mediante cualquier fuente adecuada, natural o no.

El agente puede diseñarse u obtenerse a partir de una

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MAN
13
[illegible]RID

biblioteca de compuestos que puede comprender péptidos, así como otros componentes tales como moléculas orgánicas pequeñas, como compuestos líder.

Como ejemplo, el agente puede ser una sustancia natural, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos como células o tejidos de bacterias, hongos, o animales (particularmente mamíferos), una molécula orgánica o inorgánica, un agente sintético, un agente semisintético, un mimético estructural o funcional, un péptido, un mimético de péptido, un agente derivado, un péptido cortado a partir de una proteína entera, o un péptido obtenido sintéticamente (como, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos o por técnicas recombinantes o combinaciones de éstos), un agente recombinante, un anticuerpo, un agente natural o no natural, una proteína de fusión o equivalente de ésta y mutantes, derivados o combinaciones de éstos.

Como se utiliza en la presente, el término "agente" puede ser una entidad simple o puede ser una combinación de agentes.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, tal como cuando el agente es un

PATRICIA ROSA MORENO
INGLÉS Y ALEMAN

I:NEP, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente un grupo amida (es decir N(H)-C(O)- o incluso -C(O)-N(H)-) y uno o más grupos hidrocarburo. En este caso, el término "grupo hidrocarburo" significa un grupo que comprende al menos C y H y puede comprender opcionalmente uno o más sustituyentes adecuados. Ejemplos de dichos sustituyentes pueden incluir halo, alcoxi, nitro, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes pueden formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarburo comprende más de un C, estos carbonos no tienen porque estar unidos necesariamente unos a otros. Por ejemplo, al menos dos de los carbonos pueden estar unidos a través de un elemento o grupo adecuado. De esta manera, el grupo hidrocarburo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente un grupo cíclico. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente un grupo cíclico unido a otro grupo hidrocarburo por medio de un enlace amida. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

algunas aplicaciones, tal como cuando el agente es un I:PDE, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente dos o más grupos hidrocarburo unidos. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente al menos dos grupos cíclicos, siendo opcionalmente uno de dichos grupos cíclicos una estructura de anillo cíclico condensado. Para algunas aplicaciones, al menos uno de los grupos cíclicos es preferiblemente un grupo heterocíclico. Para algunas aplicaciones, el grupo heterocíclico comprende preferiblemente al menos un N en el anillo. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, tal como cuando el agente es un I:NPY, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente dos o más grupos hidrocarburo unidos. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente al menos dos grupos cíclicos, siendo opcionalmente uno de dichos grupos cíclicos una estructura de anillo cíclico condensado. Para algunas aplicaciones, al menos uno de los grupos cíclicos es preferiblemente un grupo heterocíclico. Para algunas aplicaciones, el grupo heterocíclico comprende preferiblemente al menos un N en el anillo. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos

PAT [illegible] MORENO
INC.

de la presente.

El agente puede contener grupos halo. En este caso, "halo" significa fluoro, cloro, bromo o yodo.

El agente puede contener uno o más grupos alquilo, alcoxi, alquenilo, alquileno o alquenileno, que pueden ser de cadena lineal o ramificada.

El agente puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, como una sal de adición de ácidos o una sal básica o un solvato de éstas, incluyendo un hidrato de éstas. Para una revisión de las sales adecuadas véase Berge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19.

Las sales de adición de ácidos adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas y son ejemplos las sales clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, fosfato, fosfato ácido, acetato, maleato, fumarato, lactato, tartrato, citrato, gluconato, succinato, sacarato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, para-toluenosulfonato y pamoato.

Las sales básicas adecuadas se forman a partir de bases que

PATRICIA ... MORENO

forman sales no tóxicas y son ejemplos las sales de sodio, potasio, aluminio, calcio, magnesio, zinc y dietanolamina.

Una sal farmaceúticamente aceptable de un agente de la presente invención puede prepararse fácilmente mezclando disoluciones del agente y del ácido o base deseados, según sea apropiado. La sal puede precipitar de la disolución y recogerse por filtración o bien puede recuperarse por evaporación del disolvente.

El agente de la presente invención puede existir en forma polimórfica.

El agente de la presente invención puede contener uno o más átomos de carbono asimétricos y existir por lo tanto en dos o más formas estereoisoméricas. Cuando un agente contiene un grupo alquenilo o alquenileno puede aparecer también isomería cis (E) y trans (Z). La presente invención incluye los estereroisómeros individuales del agente y, cuando es apropiado, las formas tautoméricas individuales de éste, junto con las mezclas de éstas.

La separación de los diastereoisómeros o de los isómeros cis y trans puede conseguirse por técnicas convencionales, por ejemplo mediante cristalización fraccionada,

PATRICIA KOCH MORENO
INGL... ...AN
...RID
Tel...

717

cromatografía o HPLC de una mezcla estereoisomérica del agente o de una sal adecuada o de un derivado de éstos. Un enantiómero individual del agente puede prepararse también a partir del intermedio correspondiente ópticamente puro o por resolución, como por HPLC del correspondiente racemato utilizando un soporte quiral adecuado, o por cristalización fraccionada de las sales diastereoisoméricas formadas por reacción del correspondiente racemato con un ácido o base ópticamente activo, según sea apropiado.

La presente invención incluye también todas las variaciones isotópicas adecuadas del agente o de una sal farmacéuticamente aceptable de éste. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o de una sal farmacéuticamente aceptable de éste se define como uno en el que al menos un átomo está reemplazado por un átomo con el mismo número atómico pero con masa atómica diferente de la masa atómica encontrada habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse al agente y a las sales farmacéuticamente aceptables de éste, incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro como $^{2}\mathrm{H}$, $^{3}\mathrm{H}$, $^{13}\mathrm{C}$, $^{14}\mathrm{C}$, $^{15}\mathrm{N}$, $^{17}\mathrm{O}$, $^{18}\mathrm{O}$, $^{31}\mathrm{P}$, $^{32}\mathrm{P}$, $^{35}\mathrm{S}$, $^{18}\mathrm{F}$ y $^{36}\mathrm{Cl}$, respectivamente. Ciertas variaciones isotópicas del agente y de las sales farmacéuticamente aceptables de éste, por

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS [illegible] MADRID

ejemplo aquellas en las que se incorpora un isótopo radiactivo como $^{3}H$ o $^{14}C$, son útiles en estudios de distribución en tejidos de medicamentos y/o sustratos. Los isótopos tritio, es decir $^{3}H$ y carbono 14, es decir $^{14}C$, son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos como deuterio, es decir $^{2}H$, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas debidas a una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo un aumento de la semivida in vivo o una reducción de los requerimientos de dosificación, y por lo tanto pueden preferirse en algunas circunstancias. Las variaciones isotópicas del agente de la presente invención y de las sales farmacéuticamente aceptables de éste de esta invención pueden prepararse generalmente mediante procedimientos convencionales utilizando las variaciones isotópicas apropiadas de los reactivos adecuados.

Se apreciará por los expertos en la técnica que el agente de la presente invención puede derivar de un profármaco. Los ejemplos de profármacos incluyen entidades que tienen ciertos grupos protegidos y que pueden no poseer actividad farmacológica como tales pero que pueden administrarse, en ciertos casos, (oral o parenteralmente, por ejemplo) y a continuación metabolizarse en el cuerpo para formar el agente de la presente invención que es farmacológicamente

[illegible] MORENO
Y ALEMAN
113
MADRID

activo.

Se apreciará además que ciertos restos conocidos como "prorrestos", por ejemplo como los descritos en "Design of Prodrugs" de H. Bundgaard, Elsevier, 1985 (cuya descripción se incorpora a la presente como referencia), pueden situarse sobre funcionalidades adecuadas de los agentes. Dichos profármacos se incluyen también en el alcance de la invención.

El $P_{cAMP}$ puede realizar una o más de las siguientes funciones: aumentar directa o indirectamente la eficacia del cAMP, aumentar directa o indirectamente los niveles de cAMP, aumentar directa o indirectamente la actividad de cAMP, reducir directa o indirectamente el nivel de degradación de cAMP o reducir directa o indirectamente el nivel de inhibición de cAMP.

Preferiblemente, el agente aumenta directa o indirectamente los niveles de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

Más preferiblemente, el agente aumenta selectivamente y directa o indirectamente los niveles de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] Y ALEMAN
[illegible] MADRID

720

Más preferiblemente, el agente aumenta selectivamente y directa o indirectámente los niveles de cAMP, siendo el citado cAMP, cAMP inducido por excitación sexual.

En un aspecto altamente preferido, el agente de la presente invención aumenta la cantidad relativa de cAMP inducido por excitación sexual.

Para algunas aplicaciones, el agente trata selectivamente el FSAD.

En un aspecto, el agente puede inhibir o antagonizar una diana adecuada y, al hacerlo, potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales femeninos. En el texto se ha utilizado el término inhibidor para significar un inhibidor y/o un antagonista.

En otro aspecto, el agente puede activar o agonizar una diana adecuada y, al hacerlo, potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales femeninos. En el texto se han utilizado los términos activador e inhibidor de sobrerregulación para significar un activador y/o un sobrerregulador y/o un agonista.

De esta manera, el agente puede agonizar, antagonizar,

721

sobrerregular o inhibir una diana adecuada.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, o además, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

Preferiblemente, el agente puede agonizar selectivamente, antagonizar selectivamente, sobrerregular selectivamente o inhibir selectivamente una diana adecuada.

Preferiblemente, el agente puede agonizar selectivamente, antagonizar selectivamente, sobrerregular selectivamente o inhibir selectivamente una diana selectiva adecuada.

El agente de la presente invención puede ser capaz también de mostrar una o más propiedades funcionales beneficiosas adicionales. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede potenciar cAMP así como potenciar cGMP. Para algunas aplicaciones (tal como para administración tópica), el agente puede mostrar también una acción inhibidora de ACE (enzima conversora de angiotensina). Para algunas aplicaciones (tal como con tipos particulares de paciente), dichos agentes (es decir aquellos que muestran acción inhibidora de ACE) pueden no ser adecuados para

PATRICIA [illegible]
ING [illegible]
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

administración oral. Para algunas aplicaciones el agente puede mostrar también una acción inhibidora de ECE (enzima conversora de endotelio).

En un aspecto altamente preferido el agente no es VIP administrado exógenamente.

Esto es debido a que ha habido informes de que las infusiones de VIP conducen a efectos cardiovasculares adversos significativos, como aumentos del ritmo cardiaco y reducción de la presión sanguínea arterial diastólica (Ottesen 1983, 1987, 1995).

Además, aunque Ottesen y colaboradores han demostrado que VIP induce aumentos en el flujo sanguíneo vaginal y en la lubricación en voluntarias sanas, el mecanismo por el cual VIP ejerce sus efectos no está claro. En la bibliografía, existe una serie de ejemplos de señalización de VIP mediante distintos sistemas de segundo mensajero, por ejemplo cGMP/guanilato ciclasa (Ashur-Fabian, 1999), monóxido de carbono (CO)/hemo oxigenasa (Fan et al., 1998) y cAMP/adenilato ciclasa (Foda, 1995, Schoeffter, 1985, Gu, 1992). Esto se ejemplifica en un informe reciente que describe cómo pueden explicarse los efectos vasorrelajantes de VIP en la arteria uterina por la liberación de óxido

[illegible] MORENO
INC. [illegible] ALEMAN
[illegible] 113
[illegible]RID

nítrico (Jovanovic, 1998). De nuevo, existen también evidencias de modulación de VIP por óxido nítrico (NO)/cGMP en la función urogenital masculina (Kim, 1994).

Se ha informado en la bibliografía de que VIP no tiene efectos sobre los niveles de cAMP en cultivos de células de músculo liso vaginal (véase Traish, A., Moreland, R.B., Huang, Y., et al. (1999). Development of human and rabbit vaginal smooth muscle cell cultures: Effects of vasoactive agents on intracellular levels of cyclic nucleotides. *Mol. Cell. Biol. Res. Comm.*, 2, 131-137).

Por ello, es deseable que el agentes no sea VIP administrado exógenamente por sí solo. Sin embargo, la presente invención comprende combinaciones de agentes, siendo uno de estos agentes VIP. Sin embargo, se prefiere que ninguno de los agentes sea VIP administrado exógenamente por las razones anteriormente citadas.

Puede utilizarse el agente en combinación con uno o más de otros agentes farmacéuticamente activos, como un $P_{cGMP}$ (como sildenafilo) y/o un compuesto farmacéutico de acción central (por ejemplo un agonista de dopamina como apomorfina. Las explicaciones sobre el uso de apomorfina como compuesto farmacéutico pueden encontrarse en el documento US-A-5945117. En ese documento particular se suministra la apomorfina por vía sublingual. Además, o como alternativa, el agente puede utilizarse en combinación con uno o más de: inhibidor de PDE5 (por ejemplo sildenafilo, vardenafilo (Bayer BA 38-9456) e IC351 (Cialis, Icos Lilly)), uno o más de un agonista del receptor de dopamina (por ejemplo apomorfina), uno o más de un agonista del receptor de melanocortina (por ejemplo Melanotán II), uno o más de un abridor de canal de potasio (por ejemplo un abridor de canal $K_{ATP}$ y/o un abridor de canal de potasio activado por calcio (por ejemplo monoxidil, nicorandil)), uno o más de un agente de terapia de sustitución hormonal, uno o más de un agente de terapia de sustitución de la hormona testosterona (incluido DHEA (deshidroandrostendiona), uno o más de un agonista de estrógeno, por ejemplo Lasofoxifene, uno o más de un agonista o antagonista del receptor de serotonina, uno o más de un agonista del receptor de prostanoide (por ejemplo alprostadil).

Si se administra una combinación de agentes activos, pueden administrarse de forma simultánea, separada o secuencial.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un valor de $K_i$ inferior a aproximadamente 100 nM,

MORENO

preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un valor de $K_b$ inferior a aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un valor de $K_a$ inferior a aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM,

MORENO
MAN
113
MADRID
Telf.

preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 100 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 150 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 200 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 250 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 300 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 350 veces hacia la diana deseada.

Para algunas aplicaciones, el agente puede ser un agente vasoactivo.

## PROCEDIMIENTOS QUIMICOS DE SINTESIS

Típicamente el agente de la presente invención se preparará mediante técnicas químicas de síntesis.

El agente o diana de la presente invención o variantes,

MORENO
MADRID

727

homólogos, derivados, fragmentos o miméticos de éste pueden producirse utilizando procedimientos químicos para sintetizar el agente por entero o en parte. Por ejemplo, pueden sintetizarse los péptidos por técnicas de fase sólida, separarse de la resina y purificarse por cromatografía líquida de alta resolución (por ejemplo Creighton (1983) Proteins Structure and Molecular Principles, WH Freeman and Co., Nueva York, NY). La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse por análisis o secuenciación de aminoácidos (por ejemplo el procedimiento de degradación de Edman, Creighton, *supra*).

La síntesis directa del agente o variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos de éste puede llevarse a cabo utilizando diversas técnicas en fase sólida (Roberge J.Y., et al., (1995) Science 269: 202-204) y puede conseguirse la síntesis automatizada, por ejemplo utilizando el Sintetizador de péptidos ABI 43 1 A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Además, la secuencia de aminoácidos que comprende el agente o cualquier parte de éste, puede alterarse durante la síntesis directa y/o combinarse utilizando procedimientos químicos con una secuencia de otras subunidades, o cualquier parte de ésta, para producir

[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] MADRID

un agente o diana variante como, por ejemplo, una variante PDE, NEP o NPY.

En una realización alternativa de la invención, la secuencia de codificación de la diana, del agente o de variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos de éste puede sintetizarse, en todo o en parte, utilizando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers, M.H. et al., (1980) Nuc Acids Symp Ser 215-23, Horn T. et al, (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

## MIMETICO

Como se utiliza en la presente, el término "mimético" se refiere a cualquier compuesto químico que incluye, aunque no está limitado a ellos, un péptido, polipéptido, anticuerpo u otro compuesto químico orgánico que tiene la misma actividad o efecto cualitativo que el agente de referencia respecto de una diana.

## DERIVADO QUIMICO

El término "derivado" o "derivatizado", como se utiliza en la presente, incluye la modificación química de un agente. Un ejemplo de dichas modificaciones químicas sería el

MORENO
MADRID

reemplazamiento de hidrógeno por un grupo halo, un grupo alquilo, un grupo acilo o un grupo amino.

## MODIFICACION QUIMICA

En una realización de la presente invención el agente puede ser un agente modificado químicamente.

La modificación química de un agente de la presente invención puede estimular o reducir la interacción de puente de hidrógeno, la interacción de cargas, la interacción hidrofóbica, la interaccion de Van der Waals o la interacción de dipolos entre el agente y la diana.

En un aspecto, el agente identificado puede actuar como un modelo (por ejemplo un molde) para el desarrollo de otros compuestos.

## PROCEDIMIENTOS RECOMBINANTES

Típicamente la diana de la presente invención para uso en el ensayo de la presente invención puede prepararse por técnicas de DNA recombinante.

MORENO
113
ADRID

POTENCIACION DE cGMP

Como se utiliza en la presente con referencia al cGMP, el término "potenciar" incluye uno o más de: aumento de la eficacia del cGMP, aumento de los niveles de cGMP, aumento de la actividad de cGMP, reducción del nivel de degradación de cGMP, reducción del nivel de inhibición de cGMP.

El efecto potenciador puede ser un efecto directo. Como alternativa, podría ser un efecto secundario y/o un efecto cadena abajo.

En este caso, el agente que potencia el cGMP actúa preferiblemente como un $I_{cGMP}$ y/o un $AM_{cGMP}$, teniendo el modulador de cGMP un efecto adverso sobre cGMP, de modo que el agente reduce y/o elimina y/o enmascara y/o desvía el efecto perjudicial del $I_{cGMP}$ y/o del $AM_{cGMP}$ hacia cGMP.

Por ello, la presente invención comprende una combinación de uno o más $I:I_{cAMP}$ y uno o más $I:I_{cGMP}$.

En un aspecto, el $I:I_{cGMP}$ es un $I:PDE_{cGMP}$.

## $I_{cAMP}$ Y/O $AM_{cAMP}$

Se ha mostrado que el cAMP media el flujo sanguíneo vaginal y que estimulando la señalización de cAMP se puede estimular el flujo sanguíneo vaginal en un modelo animal. Así, un agente que sobrerregula/estimula la vasorrelajación mediada por cAMP será eficaz en el tratamiento de los FSAD. Para facilitar la referencia, nos referimos a estas sustancias como $I_{cAMP}$ y/o $AM_{cAMP}$. En este caso, los $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ tienen un efecto adverso sobre los niveles de actividad de cAMP.

Por ello, el agente puede ser uno o más de: un I:$I_{cAMP}$ y/o un I:$AM_{cAMP}$.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

Los ejemplos de $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ incluyen uno o más de PDE, NPY y NEP, o cualquier componente asociado con éstos. El componente asociado puede ser, por ejemplo, un receptor y/o un cofactor.

MORENO
MAN
113
MADRID

De esta manera, el agente puede ser preferiblemente uno o más de: un I:PDE$_{cAMP}$, un I:NPY (a veces escrito como I:NPYi), un I:NPY Y$_n$ (a veces escrito como NPY Y$_n$I), y un I:NEP.

De manera similar, el agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

### I:I$_{cAMP}$ Y/O I:AM$_{cAMP}$

Según la presente invención, se ha encontrado que es posible tratar y/o prevenir el FSAD utilizando un agente que reduce y/o elimina y/o enmascara y/o desvía y/o previene el efecto perjudicial de I$_{cAMP}$ y AM$_{cAMP}$ hacia cAMP. El agente puede incluso restablecer los niveles de cAMP que habían reducido el I$_{cAMP}$ y el AM$_{cAMP}$. En este caso, el I:I$_{cAMP}$ e I:AM$_{cAMP}$ previenen o reducen el efecto adverso sobre los niveles de actividad del cAMP.

De esta manera, en un aspecto preferido, el agente es un I:I$_{cAMP}$ y/o un I:AM$_{cAMP}$, teniendo el AM$_{cAMP}$ un efecto perjudicial sobre AM$_{cAMP}$.

MORENO
MAN
13
RID

En un aspecto preferido, el agente puede ser uno o más de:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$ (donde n indica una clase o subclase apropiada)
I:NPY
I:NPY Y$_n$ (donde n indica una clase o subclase apropiada)
I:NEP

A$_{cAMP}$

Según la presente invención, se ha encontrado que una de las causas importantes de los FSAD es debida a los bajos niveles o a la baja actividad de cAMP en los genitales femeninos.

Por ello, el agente puede ser un U:A$_{cAMP}$.

Ejemplos de A$_{cAMP}$ incluyen VIP y AC, o cualquier componente asociado a ellos. El componente asociado puede ser, por ejemplo, un receptor y/o un cofactor.

De esta manera, el agente puede ser preferiblemente uno o más de: A:AC, A:VIPr, A:VIP$_n$, I:I:VIPr o I:I:VIP$_n$.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de

MORENO
MAN
113
MADRID

exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

## U:A$_{cAMP}$

En otro aspecto, la diana es preferiblemente un componente que aumenta el nivel de cAMP. Por ello, el agente puede ser un U:AC.

Como ejemplo, la diana puede ser el cAMP mismo o AC o VIP (o combinaciones de éstos).

Por ello, como ejemplo, el agente puede ser cualquiera de: un U:A$_{cAMP}$, un A:AC, un A:VIPr, un A:VIP$_n$, un I:I:VIPr o un I:I:VIP$_n$.

## COMBINACION DE I:I$_{cAMP}$ Y/O I:M$_{cAMP}$ Y/O U:A$_{cAMP}$

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede ser una combinación de potenciadores de cAMP. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede ser dos o más de:

I:PDE$_{cAMP}$

I:PDEn$_{cAMP}$

PAT.[illegible] MORENO
[illegible] AN
113
MADRID

I:NPY

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

## COMBINACION DE MIMETICO DE cAMP e I:$I_{cAMP}$ Y/O I:$M_{cAMP}$ Y/O U:$A_{cAMP}$

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede ser una combinación de un mimético de cAMP y uno o más potenciadores de cAMP. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede ser un mimético de cAMP y uno o más de:

I:$PDE_{cAMP}$

I:$PDEn_{cAMP}$

I:NPY

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

PATRICIA MORENO
ING. SAN
MADRID
Telf.

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

INHIBIDOR

El término "inhibidor", como se utiliza en la presente con respecto al agente de la presente invención, significa un agente que puede reducir y/o eliminar y/o enmascarar y/o evitar la acción perjudicial de un $I_{cAMP}$ y/o un $M_{cAMP}$ hacia cAMP. El inhibidor puede actuar como un antagonista.

ACTIVADOR

El término "activador", como se utiliza en la presente con respecto del agente de la presente invención, significa un agente que puede aumentar y/o producir y/o desenmascarar y/o elevar y/o asegurar la acción de cAMP y/o un $A_{cAMP}$. El activador puede actuar como un agonista.

OTROS COMPONENTES ACTIVOS

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede

PATENTES [illegible] MORENO
ING. [illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

estar en combinación con uno o más de otros compuestos activos, tal como uno o más agentes capaces de potenciar cGMP.

## SECUENCIA DE AMINOACIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "proteína".

La secuencia de aminoácidos puede prepararse aislada de una fuente adecuada, o puede prepararse sintéticamente o puede prepararse mediante el uso de técnicas de DNA recombinante.

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de aminoácidos que es capaz de actuar como una diana en un ensayo para la identificación de uno o más agentes y/o derivados de éstos capaces de afectar a la secuencia de aminoácidos con el fin de potenciar el cAMP para tratar FSAD.

## SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de

[illegible] MORENO
ING. [illegible] 113
C. [illegible]
Telef. [illegible] - MADRID

nucleótidos" es sinónimo del término "polinucleótido".

La secuencia de nucleótidos puede ser DNA o RNA de origen genómico, o sintético o recombinante. La secuencia de nucleótidos puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, representando la cadena con sentido o sin sentido o combinaciones de éstas.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente DNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos está preparada preferiblemente mediante el uso de técnicas de DNA recombinante (por ejemplo DNA recombinante).

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente cDNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos puede ser preferiblemente la misma que la forma de origen natural para este aspecto.

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una sustancia capaz de actuar como una diana en un ensayo (como un ensayo de

PATRICIA KOCH MORENO
ALEMAN
MADRID

dos híbridos de levadura) para la identificación de uno o más agentes y/o derivados de éstos capaces de afectar a la sustancia a fin de potenciar el cAMP para tratar FSAD.

Un experto en la técnica comprenderá que numerosas secuencias diferentes de nucleótidos pueden codificar las dianas de la presente invención como resultado de la degeneración del código genético. Además, se comprenderá que los expertos puedan preparar, utlizando técnicas de rutina, sustituciones de nucleótidos que no afecten sustancialmente a la actividad codificada por la secuencia de nucleótidos de la presente invención para reflejar el uso del codon de cualquier organismo huésped en el que se exprese la diana de la presente invención. De esta manera, los términos "variante", "homólogo" o "derivado", en relación con la secuencia de nucleótidos descrita en los listados de secuencias adjuntos, incluyen cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazamiento de, deleción de o adición de uno (o más) ácidos nucleicos de la secuencia o a la secuencia siempre que la secuencia de nucleótidos resultante codifique una diana funcional según la presente invención (o incluso un agente según la presente invención si el citado agente comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos).

PATENTIA KOCH MORENO
MADRID

Como se ha indicado anteriormente con respecto a la homología de secuencia, existe preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90% de homología con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente. Más preferiblemente, existe al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 98% de homología. Las comparaciones de homología de nucleótidos pueden realizarse como se ha descrito anteriormente. Un programa de comparación de secuencia preferido es el programa GCG Wisconsin Bestfit descrito anteriormente. La matriz de puntuación por defecto tiene un valor de correspondencia de 10 para cada nucleótido idéntico y -9 para cada desparejamiento. La penalización por creación de un hueco por defecto es -50 y la penalización por extensión de un hueco por defecto es -3 para cada nucleótido.

La presente invención comprende también secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias presentadas en la presente, o con cualquier variante, fragmento o derivado de éstas, o con el complemento de cualquiera de las anteriores. Las secuencias de nucleótidos son preferiblemente de al menos 15 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de al menos 20, 30, 40 ó 50 nucleótidos de longitud. Estas secuencias

MORENO
MADRID

podrían utilizarse como sondas, tal como en un estuche de diagnóstico.

VARIANTES/HOMOLOGOS/DERIVADOS

Además de las secuencias de aminoácidos y de las secuencias de nucleótidos específicas mencionadas en la presente, la presente invención comprende también el uso de variantes, homólogos y derivados de éstas. En este caso, el término "homología" puede igualarse a "identidad".

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos un 75, 85 ó 90% idéntica, preferiblemente al menos un 95 ó 98% idéntica. En particular, la homología debería considerarse con respecto a aquellas regiones de la secuencia conocidas por ser esenciales para una actividad. Aunque la homología puede considerarse también en términos de similitud (es decir residuos de aminoácidos con propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología pueden realizarse manualmente, o más habitualmente, con la ayuda de programas

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] 113
MADRID

de comparación de secuencia disponibles fácilmente. Estos programas de ordenador comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina un alineamiento "sin huecos". Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se realizan sólo sobre un número relativamente pequeño de residuos.

Aunque este es un procedimiento muy simple y consistente, no consigue tener en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o una deleción producirá que los siguientes residuos de aminoácidos estén fuera de la alineación, dando como resultado potencial una gran reducción del % de homología cuando se realiza un alineamiento global. Consiguientemente, la mayoría de los procedimientos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta las posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente la puntuación general de homología. Esto se consigue

[illegible] MORENO
[illegible] Y ALEMÁN
[illegible] 113
[illegible] MADRID

insertando "huecos" en el alineamiento de secuencia para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan "penalizaciones de huecos" a cada hueco que aparece en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una secuencia de aminoácidos con tan pocos huecos como sea posible, lo que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas, conseguirán una mayor puntuación que una con muchos huecos. Los "costes de huecos afines" que se utilizan típicamente, cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco, y una penalización menor por cada residuo posterior al hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más habitualmente utilizado. Las penalizaciones por huecos mayores darán lugar por supuesto a alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se utiliza dicho software para comparaciones de secuencia. Por ejemplo, al utilizar el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase a continuación) la penalización por hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

MORENO

El cálculo del máximo % de homología requiere por lo tanto primeramente la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa de ordenador adecuado para llevar a vabo dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, EE.UU., Devereux, et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencias incluyen, aunque no están limitados a ellos, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999, ibidem, capítulo 18), FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación GENEWORKS. Ambos BLAST y FASTA están disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel et al., 1999, ibidem, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit.

Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el propio proceso de alineamiento típicamente no está basado en la comparación de pares todo-o-nada. En lugar de eso, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similitud graduada que asigna puntuaciones a cada comparación emparejada basada en la similitud química o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz utilizada habitualmente es la matriz BLOSUM62, la

MORENO
MADRID

matriz por defecto para el conjunto BLAST de programas. El programa GCG Wisconsin utiliza generalmente los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos habituales si se suministra (véase el manual del usuario para más detalles). Se prefiere utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz por defecto, como BLOSUM62.

Una vez el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software realiza esto típicamente como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

Las secuencias pueden tener también deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una sustancia de funcionalidad equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden realizarse sobre la base de similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicia, hidrofilia, y/o naturaleza anfipática de los residuos siempre y cuando se conserve la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos negativamente cargados incluyen ácido aspártico y ácido glutámico, los aminoácidos positivamente cargados incluyen lisina y arginina, y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados con valores de hidrofilia similar incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Las sustituciones conservativas pueden realizarse, por ejemplo, según la tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna, y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna, pueden sustituirse unos a otros.

| | | |
|---|---|---|
| ALIFATICO | No polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar sin carga | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar cargado | D E |
| | | K R |
| AROMATICO | | H F W Y |

La presente invención comprende también que pueda ocurrir la sustitución homóloga (sustitución y reemplazamiento se utilizan ambos en la presente para significar el intercambio de un residuo de aminoácido existente por un residuo alternativo), es decir la sustitución de similar

[illegible] MORENO [illegible] MADRID

por similar, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También puede darse la sustitución no homóloga, es decir, de una clase de residuos por otra, o implicando como alternativa la inclusión de aminoácidos no naturales como ornitina (de aquí en adelante denominada Z), ornitina de ácido diaminobutírico (de aquí en adelante denominada B), ornitina norleucina (de aquí en adelante denominada O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazamientos pueden realizarse también con aminoácidos no naturales incluyendo: aminoácidos alfa* y alfa disustituidos*, N-alquilaminoácidos*, ácido láctico*, derivados haluro de aminoácidos naturales como trifluorotirosina*, p-Cl-fenilalanina*, p-Br-fenilalanina*, p-I-fenilalanina*, L-alilglicina*, β-alanina*, ácido L-α-aminobutírico*, ácido L-γ-aminobutírico*, ácido L-α-aminoisobutírico*, ácido L-ε-aminocaproico#, ácido 7-aminoheptanoico*, L-metioninasulfona#*, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxiprolina#, L-tioprolina*, derivados metilo de fenilalanina (Phe) como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (metilo)*, L-Phe (4-isopropilo)*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico)*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-bencilo)*. La notación * se ha

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL[illegible] Y [illegible]MAN
[illegible] 113
[illegible]RID
Telf. [illegible]

utilizado con los fines de la discusión anterior (relativa a la sustitución homóloga o no homóloga), para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado, mientras que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado, #* indica características anfipáticas.

Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden estar insertados entre dos residuos de aminoácidos cualesquiera de la secuencia, incluyendo grupos alquilo como grupos metilo, etilo o propilo además de espaciadores de aminoácidos como residuos de glicina o $\beta$-alanina. Otra forma de variación, que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoide, será bien comprendida por los expertos en la técnica. Para evitar dudas "la forma peptoide" se utiliza para referirse a residuos de aminoácidos variantes en los que el grupo sustituyente del carbono $\alpha$ está sobre el átomo de nitrógeno del residuo más que sobre al carbono $\alpha$. Los procedimientos para preparar péptidos en forma peptoide son conocidos en la técnica, por ejemplo Simon, R.J., et al., PNAS (1992) 89(29), 9367-9371 y Hornwell D.C., Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

749

HIBRIDACION

La presente invención comprende también el uso de secuencias que pueden hibridarse con las secuencias diana presentadas en la presente, como si el agente fuese una secuencia sin sentido.

El término "hibridación", como se utiliza en la presente, incluye "el procedimiento mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria mediante apareamiento de bases", así como el procedimiento de amplificación como el que se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena con polimerasa (PCR).

Las secuencias de nucleótidos de la invención capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente, ó con su complemento, serán al menos un 75%, preferiblemente al menos un 85 ó 90% y más preferiblemente al menos un 95% ó 98% homólogas a las secuencias de nucleótidos complementarias correspondientes presentadas en la presente, en una región de al menos 20, preferiblemente al menos 25 ó 30, por ejemplo al menos 40, 60 ó 100 o más nucleótidos contiguos. Las secuencias de nucleótidos preferidas de la invención comprenderán regiones homólogas a la secuencia de nucleótidos descrita

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

750

en la SEC N° ID 2 del listado de secuencias de la presente invención, preferiblemente al menos un 80 ó 90%, y más preferiblemente al menos un 95% homólogas a la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC N° ID 2 del listado secuencias de la presente invención.

El término "selectivamente hibridable" significa que la secuencia de nucleótidos, cuando se utiliza como sonda, se utiliza en condiciones en las que se encuentra que la secuencia de nucleótidos diana se hibrida con la sonda a un nivel significativamente por encima del fondo. La hibridación de fondo puede aparecer debido a otras secuencias de nucleótidos presentes, por ejemplo en la biblioteca de cDNA o de DNA genómico que se rastrea. En este caso, el fondo implica un nivel de señal generada por la interacción entre la sonda y un miembro de la biblioteca de DNA no específico que tiene menos de 10 veces, preferiblemente menos de 100 veces, la intensidad de la interacción específica observada en el DNA diana. La intensidad de la interacción puede medirse, por ejemplo, por marcado radiactivo de la sonda, por ejemplo con $^{32}P$.

Las condiciones de hibridación están basadas en la temperatura de fusión (Tm) del complejo de unión del ácido nucleico, como explican Berger y Kimmel (1987, Guide to

Molecular Cloning Techniques, Methodos in Enzimology, Vol 152, Academic Press, San Diego, CA), y confieren un "rigor" definido como se explica a continuación.

El rigor máximo aparece típicamente a aproximadamente Tm-5°C (5°C por debajo de la Tm de la sonda), el rigor elevado a aproximadamente 5°C a 10°C por debajo de la Tm, el rigor intermedio a aproximadamente 10°C a 20°C por debajo de la Tm, y el rigor bajo a aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de la Tm. Como comprenderán los expertos en la técnica, una hibridación de rigor máximo puede utilizarse para identificar o detectar secuencias de nucleótidos idénticas mientras que una hibridación de rigor intermedio (o bajo) puede utilizarse para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos similares o relacionadas.

En un aspecto preferido, la presente invención cubre secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con la secuencia de nucleótidos de la presente invención en condiciones rigurosas (por ejemplo a 65°C y 0,1xSSC (1xSSC = NaCl 0,15 M, Na$_3$citrato 0,015 M, pH = 7,0). Cuando la secuencia de nucleótidos de la invención es de doble cadena, ambas cadenas del dúplex, individualmente o en combinación, están comprendidas por la presente invención. Cuando la secuencia de nucleótidos es de una cadena, se comprende que la secuencia complementaria de esa secuencia de nucleótdos está también incluida en el alcance de la presente invención.

Las secuencias de nucleótidos que no son un 100% homólogas a las secuencias de la presente invención pero que entran dentro del alcance de la invención, pueden obtenerse mediante una serie de formas. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente pueden obtenerse por ejemplo por sondeo de bibliotecas de DNA preparadas a partir de una serie de fuentes. Además, pueden obtenerse otros homólogos víricos/bacterianos o celulares, particularmente homólogos celulares encontrados en células de mamíferos, (por ejemplo células de rata, ratón, bovinas y de primate) y dichos homólogos y fragmentos de éstos serán en general capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente. Dichas secuencias pueden obtenerse sondeando bibliotecas de cDNA preparadas a partir de, o bibliotecas de DNA genómico a partir de otras especies animales y sondeando dichas bibliotecas con sondas que comprenden toda o parte de la secuencia de nucleótidos descrita en la presente en condiciones de medio a alto rigor. Se aplican consideraciones similares para obtener especies homólogas y variantes alélicas de las secuencias de aminoácidos y/o

PATRICIA ... MORENO
INGLES ... AN
... RID
Telé...

de nucleótidos de la presente invención.

Las variantes y homólogos de cepas/especies pueden obtenerse también utilizando PCR degenerada que utilizará cebadores diseñados para dirigirse a secuencias en las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, por alineamiento de las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencias pueden realizarse utilizando software informático conocido en la técnica. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp es ampliamente utilizado. Los cebadores utilizados en PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones de menor rigor que las utilizadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia simple frente a secuencias conocidas.

Como alternativa, dichas secuencias de nucleótidos pueden obtenerse por mutagénesis dirigida específica de sitio de secuencias caracterizadas, como la secuencia de nucleótidos descrita en SEC Nº ID 2 del listado de secuencias de la presente invención. Esto puede ser útil cuando se requieren por ejemplo cambios silenciosos de codón en las secuencias

PATRICIA [illegible] MORENO

para optimizar las preferencias de codón para una célula huésped particular en la que se expresan las secuencias de nucleótidos. Pueden desearse otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o para alterar la actividad de la proteína codificada por las secuencias de nucleótidos.

Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden utilizarse para producir un cebador, por ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo marcada con un marcador revelable por medios convencionales utilizando marcaje radiactivo o no radiactivo, o las secuencias de nucleótidos pueden clonarse en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos serán al menos de 15, preferiblemente al menos de 20, por ejemplo al menos de 25, 30 ó 40 nucleótidos de longitud, y están también comprendidos en el término secuencia de nucleótidos de la invención como se utiliza en la presente.

Las secuencias de nucleótidos como polinucleótidos de DNA y sondas según la invención, pueden producirse recombinantemente, sintéticamente, o mediante cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También pueden clonarse por técnicas estándar.

755

En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, implicando una fabricación por etapas de la secuencia de nucleótidos deseada, un nucleótido cada vez. Las técnicas para conseguir ésto utilizando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

Las secuencias de nucleótidos más largas generalmente se producirán utilizando medios recombinantes, por ejemplo utilizando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará preparar un par de cebadores (por ejemplo de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) adyacentes a la región de la secuencia diana que se desea clonar, poner los cebadores en contacto con mRNA o cDNA obtenido a partir de una célula animal o humana, realizar una reacción en cadena con polimerasa (PCR) en condiciones que llevan a la amplificación de la región deseada, aislan el fragmento amplificado (por ejemplo por purificación de la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperar el DNA amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de modo que el DNA amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

Debido a la degeneración inherente al código genético, pueden utilizarse otras secuencias de DNA que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos, o una funcionalmente equivalente para clonar y expresar las secuencias diana. Como comprenderán los expertos en la técnica, para ciertos sistemas de expresión, puede ser ventajoso producir las secuencias diana con codones de origen no natural. Los codones preferidos para un huésped procariota o eucariota particular (Murray et al, (1989) Nuc Acids Res 17:477-508) pueden seleccionarse, por ejemplo, para aumentar la tasa de expresión de la diana o para producir transcriptos de RNA recombinante con propiedades deseables, como una semivida más larga que los transcriptos producidos a partir de secuencias de origen natural.

## VECTORES DE EXPRESION

La secuencia de nucleótidos para uso como diana o para expresar la diana puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede utilizarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos en y/o a partir de una célula huésped compatible. La expresión puede controlarse utilizando secuencias de control que incluyen promotores/estimuladores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden utilizarse promotores procarióticos y promotores funcionales en células eucarióticas. Pueden utilizarse promotores específicos de tejido o específicos

PATENTIA [illegible] MORENO
ING. [illegible]
Tel. [illegible] MADRID

de estímulo. También pueden utilizarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes descritos anteriormente.

La proteína producida por una célula huésped recombinante mediante expresión de la secuencia de nucleótidos, puede segregarse o puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector utilizados. Las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de la sustancia codificada por las secuencias a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular.

## PROTEINAS DE FUSION

La secuencia de aminoácidos diana puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo como ayuda en la extracción y purificación. Ejemplos de compañeros de proteína de fusión incluyen glutation-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a DNA y/o activación transcripcional) y $\beta$-galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de corte proteolítico entre la secuencia del compañero de la proteína de fusión y la secuencia de proteína de interés para permitir la eliminación de las secuencias de la proteína de fusión. Preferiblemente la proteína de fusión no impedirá la actividad de la diana.

La proteína de fusión puede comprender un antígeno o un determinante antigénico condensado a la sustancia de la presente invención. En esta realización, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de origen no natural que comprende una sustancia que puede actuar como coadyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmune. El antígeno o el determinante antigénico puede estar unido al extremo amino o carboxi de la sustancia.

En otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos puede estar ligada a una secuencia heteróloga que codifica una proteína de fusión. Por ejemplo, para rastrear bibliotecas de péptidos en busca de agentes capaces de influir en la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia quimérica que exprese un epitopo heterólogo que es reconocido por un anticuerpo disponible comercialmente.

ANTICUERPOS

En una realización de la presente invención, el agente de la presente invención puede ser un anticuerpo.

Los anticuerpos pueden producirse por técnicas estándar, tal como por inmunización con la sustancia de la invención o utilizando una biblioteca de muestra de fagos.

Para los fines de esta invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique otra cosa, incluye, aunque no está limitado a ellos, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, así como miméticos de éstos. Dichos fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos enteros que conservan su actividad de unión para una sustancia diana, los fragmentos Fv, F(ab') y $F(ab')_2$, así como los anticuerpos de cadena simple (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Además, los anticuerpos y fragmentos de éstos pueden ser anticuerpos humanizados. Los anticuerpos neutralizantes, es decir, aquellos que inhiben la actividad biológica de los polipéptidos de la sustancia, son especialmente preferidos para diagnóstico y terapia.

Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un polipéptido inmunogénico que lleva un(os) epitopo(s) obtenible(s) a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención. Dependiendo de la especie huésped, pueden utilizarse diversos coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos coadyuvantes incluyen, aunque no están limitados a ellos, geles minerales de Freund como hidróxido de aluminio y sustancias activas en superficie como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa de bocallave y dinitrofenol. El BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) y el *Corynebacterium parvum* son coadyuvantes humanos potencialmente útiles que pueden emplearse si el polipéptido de la sustancia purificado se administra a individuos inmunológicamente comprometidos con el fin de estimular la defensa sistémica.

El suero del animal inmunizado se recoge y se trata según procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales hacia un epitopo obtenible a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención contiene anticuerpos hacia otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para producir y procesar los antisueros policlonales son conocidas en la técnica. Para poder preparar dichos anticuerpos, la invención proporciona también polipéptidos

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] 13
[illegible]ADRID
Tel. [illegible]

de la invención o fragmentos de éstos haptenizados por otro polipéptido para uso como inmunógenos en animales o humanos.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia epitopos obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención pueden producirse fácilmente por un experto en la técnica. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas es bien conocida. Pueden crearse líneas celulares de producción de anticuerpos inmortales por fusión celular, y también por otras técnicas como transformación directa de linfocitos B con DNA oncogénico, o transfección con virus Epstein-Barr. Pueden rastrearse los paneles de anticuerpos monoclonales producidos frente a epitopos de órbita para determinar diversas propiedades, es decir, la afinidad de isotipo y epitopo.

Los anticuerpos monoclonales de la sustancia y/o agente identificado de la presente invención pueden prepararse utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, aunque no están limitadas a ella, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Koehler y Millstein (1975 Nature 256:495-

497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., (1983) Immunol. Today 4:72, Cote et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030) y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc., pág. 77-96). Además, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", así como para la separación de genes de anticuerpo de ratón de genes de anticuerpo humanos para obtener una molécula con especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas (Morrison et al. (1984) Prc. Natl, Acad. Sci. 81:6851-6855, Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608, Takeda et al (1985) Nature 314:452-454). Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de Estados Unidos nº 4.946.779) pueden adaptarse para producir los anticuerpos de cadena sencilla específicos de la sustancia.

Los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, que están dirigidos hacia epitopos obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención son particularmente útiles en diagnóstico, y aquellos que son neutralizantes son útiles en inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales, en particular, pueden utilizarse para excitar anticuerpos anti-idiotipo. Los anticuerpos

[illegible] MORENO
[illegible]
Telf. [illegible] MADRID

anti-idiotipo son inmunoglobulinas que llevan una "imagen interna" de la sustancia y/o agente frente al que se desea protección.

Las técnicas para excitar anticuerpos anti-idiotipo son conocidas en la técnica. Estos anticuerpos anti-idiotipo pueden ser útiles también en terapia.

Los anticuerpos pueden producirse también por inducción de la producción in vivo de la población de linfocitos o por rastreo de bibliotecas de inmunoglobulinas recombinantes o paneles de reactivos de unión altamente específicos como se describen en Orlandi et al. (1989, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3822-3837) y Winter, G., y Milstein, C. (1991, Nature, 349:293-299).

También pueden generarse fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específica para la sustancia. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, aunque no están limitados a ellos, los fragmentos $F(ab')_2$ que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab que pueden generarse por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Como alternativa, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab para permitir una rápida y sencilla

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

identificación de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse W.D., et al., (1989) Science 256:1275-128 1).

## SEÑALIZADORES

Puede utilizarse una amplia variedad de señalizadores en los procedimientos de ensayo (así como en los rastreos) de la presente invención, proporcionando los señalizadores preferidos señales convenientemente detectables (por ejemplo por espectroscopía). Como ejemplo, un gen señalizador puede codificar una enzima que cataliza una reacción que altera las propiedades de absorción de luz.

Ejemplos de moléculas señalizadoras incluyen aunque no están limitadas a ellas, β-galactosidasa, invertasa, proteína de fluorescencia verde, luciferasa, cloranfenicol, acetiltransferasa, β-glucuronidasa, exo-glucanasa y glucoamilasa. Como alternativa, pueden incorporarse nucleótidos marcados radiactivamente o marcados fluorescentemente a transcriptos nacientes que se identifican después cuando se unen a las sondas de oligonucleótidos.

En una realización preferida, la producción de la molécula

PATRICIA ROSH MORENO
INGLÉS Y ...AN
...13
Telf. ... MADRID

de señalizador se mide por la actividad enzimática del producto del gen señalizador, como la $\beta$-galactosidasa.

Se conocen en la técnica una serie de protocolos para detectar y medir la expresión de la diana, tal como utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos de la proteína. Los ejemplos incluyen enzimoinmunoensayo (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas fluorescentes (FACS). Se prefiere un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales de dos sitios, que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos con dos epitopos no interferentes en polipéptidos, pero puede emplearse un ensayo de unión competitiva. Estos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, en Hampton R., et al. (1990), Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul MN) y Maddox D.E. e al., (1983 , J. Exp. Med. 15 8:121 1).

Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de técnicas de marcaje y conjugación que pueden utilizarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir hibridación marcada a sondas PCR para detectar las secuencias del polinucleótido diana incluyen el marcaje de oligonucleótidos, traducción por muescas, marcaje terminal o amplificación por PCR utilizando un oligonucleótido marcado. Como alternativa, la secuencia de codificación, o cualquier porción de ella, puede clonarse en un vector para la producción de una sonda de mRNA. Dichos vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles y pueden utilizarse para sintetizar sondas de RNA in vitro por adición de una polimerasa de RNA apropiada como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados.

Una serie de compañías como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp. (Cleveland, OH) suministran estuches comerciales y protocolos para estos procedimientos. Las moléculas señalizadoras o marcadores adecuadas incluyen radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que explican el uso de dichos marcadores incluyen los documentos US-A-3817837, US-A-3850752, US-A-3939350, US-A-3996345, US-A-4277437, US-A-4275149 y US-A-4366241. Además, las inmunoglobulinas recombinantes pueden producirse como se muestra en el documento US-A-4816567.

Los procedimientos adicionales para cuantificar la expresión de una molécula particular incluyen el marcaje

[illegible] MORENO

radiactivo (Melby, P.C., et al. 1993, J. Immunol. Methods 159:235-44) o la biotinilación (Duplaa, C.et al., 1993, Anal. Biochem. 229-36) de nucleótidos, la coamplificación de un ácido nucleico control y curvas estándar en las que se interpolan los resultados experimentales. La cuantificación de muestras múltiples puede acelerarse realizando el ensayo en formato ELISA, en el que el oligómero de interés se presenta a varias diluciones y la respuesta espectrofotométrica o calorimétrica proporciona una rápida cuantificación.

Aunque la presencia/ausencia de expresión de un gen marcador sugiere que el gen de interés está también presente, su presencia y su expresión deben confirmarse. Por ejemplo, si la secuencia de nucléotidos se inserta en una secuencia de un gen marcador, las células recombinantes que contienen el mismo pueden identificarse por la ausencia de la función del gen marcador. Como alternativa, un gen marcador puede colocarse en tándem con una secuencia de codificación diana bajo el control de un promotor simple. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o selección indica habitualmente la expresión de la diana también.

Como alternativa, las células huésped que contienen la secuencia de codificación para la diana y que expresan las regiones de codificación de la diana pueden identificarse mediante una serie de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, aunque no están limitados a ellos, la hibridación DNA-DNA o DNA-RNA y la técnica de bioensayo o inmunoensayo de proteínas, que incluyen tecnologías basadas en membrana, basadas en disoluciones o basadas en chips para la detección y/o cuantificación del ácido nucleico o de la proteína.

## ENSAYOS GENERALES DE LA ACTIVIDAD/NIVELES DE cAMP

Puede determinarse la capacidad de un agente de ensayo para potenciar el cAMP midiendo un aumento o reducción relevante de un nivel diana. Además, o como alternativa, puede determinarse la capacidad de un agente de ensayo para potenciar el cAMP midiendo un aumento relevante de los niveles de cAMP. Como ejemplo, pueden adaptarse las explicaciones de Smith et al., 1993 (Appl. Biochem. Biotechol., 41:189-218). Existen también estuches de inmunoensayo disponibles comercialmente para la medida del cAMP (por ejemplo Amersham International, Arlington Heights, IL y DuPont, Boston, MA). Se proporcionan los detalles de un ensayo de cAMP adecuado en la sección experimental.

RASTREOS

Puede utilizarse cualquiera de una o más dianas adecuadas, como una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos, para identificar un $P_{cAMP}$ en cualquiera de una serie de técnicas de rastreo de medicamentos. La diana empleada en dicho ensayo puede estar libre en disolución, fijada a un soporte sólido, portada sobre una superficie celular o localizada intracelularmente. Puede medirse la anulación de la actividad de la diana o la formación de complejos de unión entre la diana y el agente a ensayar.

Las técnicas de rastreo de medicamentos pueden basarse en el procedimiento descrito en Geysen, solicitud de patente europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. En resumen, se sintetiza un gran número de diferentes compuestos de ensayo peptídicos pequeños sobre un sustrato sólido, como puntas de plástico o alguna otra superficie. Se hacen reaccionar los compuestos peptídicos de ensayo con una diana adecuada o fragmento de ésta y se lavan. Se detectan entonces las entidades unidas, por ejemplo procedimientos de adaptación adecuados bien conocidos en la técnica. También pueden recubrirse directamente con una

770

diana purificada placas para uso en técnicas de rastreo de medicamentos. Como alternativa, pueden utilizarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

Esta invención contempla también el uso de ensayos de rastreo de medicamentos competitivos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a una diana compiten específicamente con un compuesto de ensayo para la unión a la diana.

Otra técnica de rastreo proporciona un rastreo de alto rendimiento (HTS) de agentes con afinidad de unión adecuada hacia las sustancias y está basado en el procedimiento descrito en el documento WO 84/03564.

Se espera que los procedimientos de ensayo de la presente invención sean adecuados para el rastreo tanto a pequeña como a gran escala de los compuestos de ensayo, así como en ensayos cuantitativos.

De esta manera, la presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian el cAMP, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada con el agente y medir entonces la

MORENO
MADRID
Tel

actividad y/o niveles de cAMP.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian selectivamente el cAMP en genitales sexuales femeninos, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada de los genitales sexuales femeninos con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de cAMP.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian el cAMP, comprendiendo el procedimiento poner en contacto un objetivo adecuado con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles del objetivo.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de identificar agentes que potencian selectivamente el cAMP en genitales sexuales femeninos, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuado de los genitales sexuales femeninos con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles del objetivo.

En un aspecto preferido, el rastreo de la presente invención comprende al menos las siguientes etapas (que no tienen porqué estar en este mismo orden consecutivo): (a)

13 MADRID

realizar un rastreo in vitro para determinar si un agente candidato tiene la actividad relevante (tal como por modulación de PDEII y/o NEP, como NEP de riñón de perro), (b) realizar uno o más rastreos selectivos para determinar la selectividad del citado agente candidato (por ejemplo para ver si el citado agente es también un inhibidor de ACE, utilizando, por ejemplo, el protocolo de ensayo presentado en la presente) y (c) realizar un rastreo in vivo con el citado agente candidato (por ejemplo utilizando un modelo animal funcional). Típicamente, si el citado agente candidato pasa el rastreo (a) y el rastreo (b), se realiza el rastreo (c).

## DIAGNOSTICOS

La presente invención proporciona también una composición o estuche de diagnóstico para la detección de una predisposición al FSAD. A este respecto, la composición o estuche comprenderá una entidad que es capaz de indicar la presencia de uno o más, o incluso la ausencia de uno o más, de las dianas en una muestra de ensayo. Preferiblemente, la muestra de ensayo se obtiene a partir de genitales sexuales femeninos o de una secreción de éstos.

Como ejemplo, la composición de diagnóstico puede

PAT... MORENO
ING... AN
... 13
... RID
Tel

comprender cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente o una variante, homólogo, fragmento o derivado de éstos, o una secuencia capaz de hibridarse con toda o con una parte de cualquiera de las secuencias de nucleótidos.

Para proporcionar una base para el diagnóstico de la enfermedad, deben establecerse valores patrón o valores normales de una diana. Esto pueden conseguirse combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con un anticuerpo hacia una diana, en condiciones adecuadas para la formación de complejos, que son bien conocidas en la técnica. La cantidad de formación de complejo patrón puede cuantificarse por comparación con una serie de diluciones de controles positivos en los que se combina una cantidad conocida de anticuerpo con concentraciones conocidas de una diana purificada. Después, los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por FSAD. La desviación entre los valores patrón y los del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad.

Una diana control, o cualquier parte de ella, puede proporcionar la base para un compuesto de diagnóstico y/o

MORENO

terapéutico. Con fines de diagnóstico, las secuencias de polinucleótidos diana pueden utilizarse para detectar y cuantificar la expresión genética en dolencias, trastornos o enfermedades en las que pueda estar implicado el FSAD.

La secuencia de polinucleótidos que codifica la diana puede utilizarse para el diagnóstico del FSAD resultante de la expresión de la diana. Por ejemplo, las secuencias de polinuclétidos que codifican una diana pueden utilizarse en ensayos de hibridación o de PCR de tejidos procedentes de biopsias o autopsias o fluidos biológicos, para detectar anormalidades en la expresión de la diana. La forma de dichos procedimientos cuantitativos o cualitativos puede incluir análisis Southern o Northern, transferencia por puntos u otras tecnologías basadas en membrana, tecnologías PCR, varillas de sondeo, tecnologías de puntas o chips, y ELISA u otras tecnologías de formato de múltiples muestras. Todas estas técnicas son bien conocidas en la técnica y son de hecho la base de muchos estuches de diagnóstico comercialmente disponibles.

Dichos ensayos pueden ajustarse para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico particular y pueden utilizarse en estudios animales, en ensayos clínicos o para monitorizar el tratamiento de un paciente individual. Para proporcionar una base para el diagnóstico de una enfermedad debe establecerse un perfil normal o patrón para la expresión de la diana. Esto se consigue combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con la diana o una porción de ésta, en condiciones adecuadas para la hibridación o amplificación. La hibridación patrón puede cuantificarse por comparación de los valores obtenidos de sujetos normales con una serie de diluciones de controles positivos ensayados en el mismo experimento, en que se utiliza una cantidad conocida de diana purificada. Los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por un trastorno o enfermedad relacionado con la expresión de la secuencia de codificación de la diana. La desviación entre los valores patrón y los del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad. Si se establece la enfermedad, se administra un agente terapéutico existente y pueden generarse valores o perfiles de tratamiento. Finalmente, puede repetirse el ensayo regularmente para evaluar si los valores se alejan o se acercan al esquema normal o patrón. Los perfiles de tratamiento sucesivos pueden utilizarse para mostrar la eficacia del tratamiento durante un periodo de varios días o varios meses.

De esta manera, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido diana o una variante, homólogo, fragmento o derivado de éste, para producir anticuerpos anti-diana que pueden, por ejemplo, utilizarse como diagnóstico para detectar y cuantificar los niveles de diana en estados de los FSAD.

La presente invención proporciona también ensayos y estuches de diagnóstico para la detección de una diana en células y tejidos, que comprenden una diana purificada que puede utilizarse como control positivo, y anticuerpos anti-diana. Dichos anticuerpos pueden utilizarse en tecnologías basadas en disoluciones, basadas en membrana o basadas en tejidos para detectar cualquier estado de enfermedad o dolencia relacionado con la expresión de la proteína diana o con la expresión de las deleciones o de una variante, homólogo, fragmento o derivado de éste.

## PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO

Las composiciones y/o procedimientos y/o estuches de diagnóstico pueden utilizarse en las siguientes técnicas que incluyen, aunque no están limitadas a ellos, ensayos competitivos y no competitivos, radioinmunoensayo, ensayos de bioluminiscencia y quimioluminiscencia, ensayos

PATENTES MORENO
MADRID

fluorométricos, ensayos de "en sandwich", ensayos inmunorradiométricos, transferencia por puntos, ensayos ligados a enzimas, incluyendo ELISA, placas de microensayo, bandas recubiertas de anticuerpos o varillas de sonda para una rápida monitorización de la orina o sangre, inmunoquímica e inmunocitoquímica.

Como ejempo, un estuche inmunohistoquímico puede utilizarse también para la localización de actividad NEP, PDE o NPY en tejido genital. Este estuche de inmunohistoquímica permite la localización de NEP, PDE o NPY en secciones de tejido y en células cultivadas utilizando tanto microscopía óptica como electrónica, que puede utilizarse con fines tanto de investigación como clínicos. Dicha información puede ser útil para diagnóstico y posiblemente para fines terapéuticos en la detección y/o prevención y/o tratamiento de la FSD, como FSAD. Para cada estuche se establecen un intervalo, sensibilidad, precisión, fiabilidad, especificidad y reproducibilidad del ensayo. La variación intraensayo e interensayo se establece en los puntos al 20%, 50% y 80% de las curvas estándar de desplazamiento o actividad.

MORENO MADRID

## SONDAS

Otro aspecto de la invención en cuestión es la provisión de sondas de hibridación de ácidos nucleicos o de PCR que son capaces de detectar secuencias de polinucleótidos (especialmente aquellas que son capaces de seleccionar selectivamente), incluyendo secuencias genómicas, que codifican una región de codificación de la diana o moléculas estrechamente relacionadas, como alelos. La especificidad del la sonda, es decir, si deriva de una región o dominio altamente conservado, conservado o no conservado, y el rigor de la hibridación o amplificación (alto, intermedio, bajo) determinarán si la sonda identifica sólo las secuencias de codificación de la sonda de origen natural, o secuencias relacionadas. Las sondas de detección de secuencias de ácidos nucleicos relacionados se seleccionan de regiones de nucleótidos conservadas o altamente conservadas de los miembros de la familia de la diana y dichas sondas pueden utilizarse en un conjunto de sondas degeneradas. Para la detección de secuencias de ácidos nucleicos idénticas, o cuando se desea una máxima especificidad, las sondas de ácidos nucleicos se seleccionan de regiones de nucleótidos no conservadas o regiones únicas de los polinucleótidos diana. Como se utiliza en la presente, el término "región de nucleótidos

[illegible] 13 [illegible] MADRID

779

no conservada" se refiere a un región de nucleótisos que es única en una secuencia de codificación de objetivo descrita en la presente y que no aparece en miembros de la familia relacionados.

La PCR, como se describe en los documentos US-A-4683195, US-A-4800195 y US-A-4965188, proporciona usos adicionales para los oligonucleótidos basados en secuencias diana. Dichos oligonucleótidos generalmente se sintetizan químicamente, pero pueden generarse enzimáticamente o producirse a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros comprenden generalmente dos secuencias de nucleótidos, una de orientación con sentido (5'->3') y otra de orientación sin sentido (3'->5') empleadas en condiciones optimizadas para la identificación de un gen o estado específico. Estos dos mismos oligómeros, conjuntos encajados de oligómeros, o incluso un conjunto degenerado de oligómeros, pueden emplearse en condiciones menos rigurosas para la detección y/o cuantificación de secuencias de DNA o RNA estrechamente relacionadas.

La secuencia de ácidos nucleicos para una diana puede utilizarse también para generar sondas de hibridación, como se ha descrito anteriormente, para mapear la secuencia genómica endógena. La secuencia puede mapearse en un

MORENO MADRID Tel.

cromosoma particular o en una región específica del cromosoma utilizando técnicas bien conocidas. Estas incluyen hibridación in situ para dispersiones cromosómicas (Verma et al. (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York City), preparaciones cromosómicas con clasificación de flujo o construcciones de cromosomas artificiales como YAC, cromosomas bacterianos artificiales (BAC), construcciones bacterianas PI o bibliotecas de cDNA de cromosomas simples.

La hibridación in situ de preparaciones cromosómicas y las técnicas de mapeo físico, como el análisis de ligamiento utilizando marcadores cromosómicos establecidos, son inestimables en la extensión de los mapas genéticos. Pueden encontrarse ejemplos de mapas genéticos en Science (1995, 270:410 y siguientes y 1994, 265:1981 y siguientes). A menudo, la posición de un gen en un cromosoma de otra especie de mamífero puede revelar marcadores asociados incluso si el número o el brazo de un cromosoma humano particular no es conocido. Pueden asignarse nuevas secuencias a los brazos cromosómicos, o a partes de éstos, por mapeo físico. Esto proporciona información valiosa a los investigadores que buscan los genes de las enfermedades utilizando clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Una vez se ha localizado

MORENO
MADRID
Tel.

aproximadamente una enfermedad o síndrome por ligamiento genético a una región genómica particular, cualquier mapeo de secuencias de ese área puede representar genes asociados o reguladores para investigaciones posteriores. La secuencia de nucleótidos objeto de la invención puede utilizarse también para detectar diferencias en la localización cromosómica debida a translocación, inversión, etc., entre individuos normales, portadores o afectados.

## CELULAS HUESPED

El término "célula huésped" en relación con la presente invención incluye cualquier célula que podría comprender la diana del agente de la presente invención.

De esta manera, otra realización de la presente invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas con un polinucleótido que es o que expresa la diana de la presente invención. Preferiblemente, el citado polinucleótido se lleva en un vector de replicación y expresión de los polinucleótidos que son la diana o que expresan la diana. Las células se elegirán para que sean compatibles con el citado vector y pueden ser por ejemplo células procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levadura o de plantas.

PATENTES [illegible] INC. [illegible] MADRID Telé. [illegible]

La bacteria gram-negativa *E. coli* se utiliza ampliamente como huésped para la expresión de genes heterólogos. Sin embargo, tienden a acumularse grandes cantidades de proteína heteróloga dentro de la célula. La purificación posterior de la proteína deseada de las proteínas intracelulares de *E. coli* en bruto puede ser difícil a veces.

En contraposición con *E. coli*, las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como huéspedes heterólogos por su capacidad de segregar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como huéspedes son las de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención, y/o del deseo de un procesamiento posterior de la proteína expresada, pueden preferirse huéspedes eucarióticos como levaduras u otros hongos. En general, se prefieren las células de levadura frente a las células fúngicas porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas las segregan mal las células de levadura, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo hiperglicosilación en levadura). En estos casos, debe seleccionarse un organismo huésped fúngico diferente.

PATRICIA
MORENO
MADRID

Ejemplos de huéspedes de expresión adecuados dentro del alcance de la presente invención son hongos como la especie *Aspergillus* (como las descritas en el documento EP-A-0184438 y EP-A-0284603) y especie *Trichoderma*, bacterias como la especie *Bacillus* (como las descritas en los documentos EP-A-0134048 y EP-A-0253455), la especie *Streptomyces* y especie *Pseudomonas* y levaduras como la especie *Kluyveromyces* (como las descritas en los documentos EP-A-0096430 y EP-A-0301670) y la especie *Saccharomyces*. Como ejemplo, los huéspedes de expresión típicos pueden seleccionarse de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger var. tubigensis*, *Aspergillus niger var. awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus orvzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis y Saccharomyces cerevisiae*.

El uso de células huésped adecuadas, como células huésped de levaduras, hongos y plantas, puede proporcionar modificaciones post-transcripcionales (por ejemplo miristoilación, glicosilación, truncado, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) como puede ser necesario para conferir una actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinante de la presente invención.

PATENTES [illegible] MORENO [illegible] MADRID

## ORGANISMO

El término "organismo" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que podría comprender la diana según la presente invención y/o productos obtenidos de ésta. Los ejemplos de organismos pueden incluir un hongo, levadura o planta.

El término "organismo transgénico" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprende la diana según la presente invención y/o los productos obtenidos.

## TRANSFORMACION DE CELULAS HUESPED/ORGÁNISMOS HUESPED

Como se indicó anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las explicaciones sobre la transformación de huéspedes procarióticos está bien documentada en la técnica, por ejemplo véase Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2° edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

[illegible] MORENO [illegible] RID

Si se utiliza un huésped procariótico, puede ser necesario modificar la secuencia de nucleótidos antes de la transformación, tal como por eliminación de intrones.

En otra realización, el organismo transgénico puede ser una levadura. A este respecto, las levaduras también se han utilizado ampliamente como vehículo para la expresión de genes heterólogos. La especie *Saccharomyces cerevisiae* tiene una larga historia de uso industrial, incluyendo su uso para la expresión de genes heterólogos. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido revisada por Goodey et al (1987, Yeast Biotechnology, D.R. Berry et al., eds., pág. 401-429, Allen y Unwin, Londres) y por King, et al. (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E.F. Walton y G.T. Yarronton, eds., pág. 107-133, Blackie, Glasgow).

Por varias razones, *Saccharomyces cerevisiae* es adecuada para la expresión de genes heterólogos. En primer lugar, no es patogénica para humanos y es incapaz de producir ciertas endotoxinas. En segundo lugar, tiene una larga historia de uso seguro durante siglos de explotación comercial con varios fines. Esto ha llevado a una amplia aceptación del público. En tercer lugar, el uso comercial e investigación dedicadas al organismo ha dado como

MORENO
MAN
113
MADRID

resultado una riqueza de conocimientos sobre su genética y fisiología así como sobre las características de fermentación a gran escala de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se proporciona una revisión de los principios de la expresión de genes heterólogos en Sacccharomyces cerevisiae y de la secreción de productos genéticos en H. Hinchcliffe, E. Kenny (1993, "Yeast as a vehicule for the expression of heterologous genes", Yeasts, vol 5, Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, eds., 2ª edición, Academic Press Ltd.).

Están disponibles varios tipos de vectores de levaduras, incluyendo vectores integradores, que necesitan la recombinación con el genoma del huésped para su mantenimiento y la replicación autónoma en vectores plásmidos.

Para preparar Saccharomyces transgénica, se preparan las construcciones de expresión por inserción de la secuencia de nucleótidos de la presente invención en una construcción diseñada para la expresión en levadura. Se han desarrollado varios tipos de construcciones utilizadas para la expresión heteróloga. Las construcciones contienen un promotor activo en levadura fusionado con la secuencia de nucleótidos de la presente invención, habitualmente se utiliza un promotor de origen de levadura, como el promotor GAL1. Habitualmente se utiliza una secuencia señal proveniente de levadura, como la secuencia que codifica el péptido señal SUC2. Un terminador activo de levadura termina el sistema de expresión.

Para la transformación de levaduras se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, puede prepararse una Saccharomyces transgénica según la presente invención siguiendo las expliaciones de Hinnen et al. (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929), Beggs, J.D. (1978, Nature, Londres, 275, 104) e Ito, H. et al. (1983, J. Bacteriology 153, 163-168).

Las células de levadura transformadas se seleccionan utilizando diversos marcadores selectivos. Entre los marcadores utilizados para la transformación existe una serie de marcadores auxotróficos como LEU2, HIS4 y TRP1, y marcadores de resistencia a antibióticos dominantes como marcadores del antibiótico aminoglicósido, por ejemplo G418.

Otro organismo huésped es una planta. El principio básico en la construcción de plantas genéticamente modificadas es insertar información genética en el genoma de la planta de modo que se obtenga un mantenimiento estable del material genético insertado. Existen algunas técnicas para la inserción de información genética, siendo las dos principales la introducción directa de la información genética y la introducción de la información genetica mediante el uso de un sistema de vector. Puede encontrarse una revisión de las técnicas generales en los artículos de Potrykus (Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech Marzo/abril 1994 17-27). Pueden encontrarse otras explicaciones sobre transformación de plantas en el documento EP-A-0449375.

De esta manera, la presente invención proporciona también un procedimiento de transformación de una célula huésped con una secuencia de nucleótidos que debe ser la diana o que debe expresar la diana. Las células huésped transformadas con la secuencia de nucleótidos pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede segregarse o puede contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector utilizado. Como comprenderán los expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación pueden diseñarse

PATRICIA MORENO
MADRID

con secuencias señal que dirijan las secreción de las secuencias de codificación a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular. Otras construcciones recombinantes pueden unir la secuencia de codificación a la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de las proteínas solubles (Kroll D.J. et al, (1993), DNA Cell. Biol. 12:441-53).

## COMPOSICIONES FARMACEUTICAS

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo combinaciones de éstos).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria y comprenderá típicamente uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos o diluyentes para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen en, por ejemplo Pharmaceutical Sciences de Remington, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit., 1985). La selección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede hacerse con respecto a la vía prevista de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmaceúticas pueden comprender como vehículo, excipiente o diluyente, o además de los mismos, cualquier ligante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento o agente(s) de solubilización.

Pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, tintes y agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido para-hidroxibenzoico. También pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión.

Puede haber diferentes requerimientos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de suministro. Como ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para suministrarse utilizando una minibomba o por vía mucosa, por ejemplo en forma de un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o disolución ingerible, o parenteralmente, en la que la composición se formula en una forma inyectable para suministro, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Como alternativa, la formulación puede diseñarse para ser suministrada por ambas vías.

Cuando el agente se va a suministrar por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debería ser capaz de permancer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal, por ejemplo debería ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detersivos de la bilis.

Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inhalación, en forma de supositorio o de pesario, tópicamente en forma de una loción, disolución, crema, ungüento o polvo, utilizando un parche dérmico, oralmente en forma de comprimidos que contienen excipientes como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, disoluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse preferiblemente en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o monosacáridos suficientes para hacer la disolución isotónica con la sangre. Para la administración bucal o

MORENO
MADRID

sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas que pueden formularse de manera convencional.

Preferiblemente, el agente está en una forma que es adecuada para suministro oral.

Para algunas realizaciones el agente, cuando se utiliza, preferiblemente no actúa sobre el sistema nervioso central.

Para algunas realizaciones el agente, cuando se utiliza, preferiblemente es de actuación periférica.

ADMINISTRACION

Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, peso, y respuesta del paciente particular. Las dosificaciones a continuación son ilustrativas del caso medio. Puede haber casos, por supuesto, en que sean necesarios intervalos de dosificación mayores o menores.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por inyección directa. La composición puede formularse para administración parenteral, mucosa,

MORENO
MADRID

intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular o transdérmica. Dependiendo de la necesidad, el agente puede administrarse a una dosis desde 0,01 a 30 mg/kg de peso corporal, tal como de 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal.

El término "administrado" incluye el suministro por técnicas víricas o no víricas. Los mecanismos de suministro vírico incluyen, aunque no están limitados a ellos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores víricos de herpes, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos y vectores baculovíricos. Los mecanismos de suministro no vírico incluyen transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, compuestos anfifílicos faciales catiónicos (CFA) y combinaciones de éstos. Las vías para dichos mecanismos de suministro incluyen, pero no están limitadas a, vías mucosa, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, tópica o sublingual.

Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de éstas) de la presente invención pueden administrarse por inyección directa. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de éstas) de la presente invención pueden administrarse

794

tópicamente. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de éstas) de la presente invención pueden administrarse por inhalación. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de éstas) de la presente invención pueden administrarse por una o más de: una vía mucosa, por ejemplo en forma de un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o en forma de disolución ingerible como por vía oral, o por vía parenteral cuando el suministro está en forma inyectable, como por ejemplo por vía rectal, oftálmica (incluyendo intravítrea o intracameral), nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), intrauterina, vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intracraneana, intratraqueal y epidural), transdérmica, intraperitoneal, intracraneal, intracerebroventricular, intracerebral, intravagianl, intrauterina o parenteral (por ejemplo intravenosa, intraespinal, subcutánea, transdérmica o intramuscular).

Como ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse según un régimen de 1 a 10 veces al día, como una o dos veces al día. El nivel específico de dosis y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente en particular pueden variar y dependerán de una serie de factores incluyendo la actividad del

MORENO
MAN
113
ADRID

compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el modo y el momento de administración, la tasa de excreción, la combinación de medicamentos, la gravedad del estado en particular y la terapia individual experimentada.

Por ello, el término "administrado" incluye, pero no está limitado a ellos, suministro por vía mucosa, por ejemplo en forma de un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o en forma de una disolución ingerible, por vía parenteral en la que el suministro es por medio de una forma inyectable, como por ejemplo, por vía intravenosa, intramusculr o subcutánea.

Para algunas aplicaciones el agente se administra preferiblemente de forma oral.

Para algunas aplicaciones el agente se administra preferiblemente de forma tópica.

Los agentes de la presente invención pueden administrarse por separado, pero generalmente se administrarán en combinación con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado con respecto a la

MORENO
AN
113
MADRID

vía prevista de administración y la práctica farmacéutica estándar.

Pro ejemplo, el agente puede administrarse oral, bucal o sublingualmente en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes para aplicaciones de liberación inmediata, retrasada, modificada, sostenida, por pulsos o controlada.

Los comprimidos pueden contener excipientes como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio y glicina, disgregantes como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón de sodio, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos y ligantes de granulación como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sucrosa, gelatina y goma arábiga. Además pueden incluirse agentes lubricantes como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa,

PAT[illegible] MORENO
ING [illegible] LMAN
[illegible] 113
Tel [illegible] - MADRID

797

almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para las suspensiones acuosas y/o elixires, el agente puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, material colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de éstos.

Como se ha indicado, el agente puede administrarse parenteralmente, por ejemplo por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intrasternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o puede administrarse por técnicas de infusión. Para dichas administraciones parenterales se utiliza mejor la forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o glucosa suficiente para hacer la disolución isotónica con la sangre. Las disoluciones acuosas deberán estar adecuadamente tamponadas (preferiblemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se consigue fácilmente por ténicas farmacéuticas estándares conocidas por los expertos en la técnica.

Para administración oral y parenteral a pacientes humanos, el nivel de dosificación diaria del agente puede ser en dosis sencillas o divididas.

De esta manera, los comprimidos o cápsulas del agente pueden contener cantidades adecuadas del compuesto activo para administración de uno en uno o dos o más a la vez, según sea apropiado. El médico determinará en cualquier caso la dosificación real que será más adecuada para cualquier paciente individual. Las dosis anteriores son ilustrativas del caso medio. Puede haber casos individuales, por supuesto, en que sean necesarios intervalos de dosificación mayores o menores y éstos están en el alcance de esta invención. El experto en la técnica apreciará que, en el tratamiento de ciertas afeccione, el agente puede tomarse en forma de una dosis sencilla según se desee o requiera.

Como se ha indicado, el agente de la presente invención puede administrarse intranasalmente o por inhalación y se suministra convenientemente en forma de una presentación de inhalador de polvo seco o aerosol pulverizador de envase presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un impulsor adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA

MORENO
MAN
113
MADRID

134A™) o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA™), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis unitaria puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. El envase presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador puede contener una disolución o suspensión del compuesto activo, por ejemplo utilizado una mezcla de etanol y el impulsor como disolvente, que puede contener además un lubricante, por ejemplo trioleato de sorbitano. Las cápsulas y cartuchos (preparados por ejemplo a partir de gelatina) para uso en un inhalador o insuflador, pueden formularse para contener una mezcla de polvos del agente y una base en polvo adecuada como lactosa o almidón.

Como alternativa, el agente de la presente invención puede administrarse en forma de un supositorio o pesario, o puede aplicarse tópicamente en forma de un gel, hidrogel, loción, disolución, crema, ungüento o polvo. El agente de la presente invención puede administrarse también por vía dérmica o transdérmica, por ejemplo mediante el uso de un parche dérmico. También puede administrarse por vía pulmonar o rectal. También puede administrarse por vía ocular. Para uso oftálmico, los compuestos pueden formularse como suspensiones micronizadas en suero salino isotónico de pH ajustado o, preferiblemente, como

MORENO
MADRID

disoluciones en suero salino estéril isotónico con el pH ajustado opcionalmente, en combinación con un conservante como cloruro de bencilalconio. Como alternativa, puede formularse en un ungüento tal como vaselina.

Para la aplicación tópica a la piel, el agente de la presente invención puede formularse como un ungüento adecuado que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulsionadora y agua. Como alternativa, puede formularse como una loción o crema adecuada, suspendida o disuelta en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoesteraro de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de cetilésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

## MODELOS DE ENSAYO ANIMAL

Pueden utilizarse modelos in vivo para investigar y/o diseñar terapias o agentes terapéuticos para tratar FSAD. Los modelos podrían utilizarse para investigar el efecto de diversas herramientas/compuestos líder sobre una serie

PATRICIA ... MORENO
... MADRID

de parámetros que indican la respuesta de excitación sexual. Estos modelos de ensayo animal pueden utilizarse como, o en, el ensayo de la presente invención. El modelo de ensayo animal será un modelo de ensayo animal no humano.

Existe una serie de modelos animales para la disfunción sexual femenina vasculogénica (FSAD) disponibles que pueden utilizarse.

Como ejemplo, puede hacerse referencia a modelos animales invasivos (por ejemplo véase Park et al., 1997). En este caso, las respuestas hemodinámicas vaginal y clitorídea pueden registrarse directamente a continuación de la estimulación del nervio pélvico en conejos hembras normales y ateroscleróticos (un modelo validado de los FSAD). Los efectos in vivo de los potenciadores de cAMP, tales como agentes vasodilatadores como antagonistas NPY o agonistas VIP, pueden investigarse en animales normales o con FSAD.

Como otro ejemplo, puede hacerse referencia a modelos animales no invasivos (por ejemplo véase la revisión de Goldstein et al., 1998, Laan et al., 1998). En este caso, la ultrasonografía de onda Doppler por pulsos proporciona el medio para detectar los cambios de flujo sanguíneo en las arterias vaginal y clitorídea. Este modelo puede

[illegible] MORENO
[illegible] JUAN
13
MADRID
Tel

utilizarse para investigar los efectos vasculogénicos durante la administración de vasodilatadores.

Otras técnicas no invasivas que pueden utilizarse incluyen fotopletismografía vaginal, que proporciona una medida cuantitativa de la congestión de la mucosa vaginal, y técnicas de compensación térmica vaginal, que están basadas en el principio de que los cambios en el flujo sanguíneo vaginal pueden registrarse midiendo la transferencia de calor de una sonda intravaginal mantenida a temperatura constante.

En un aspecto preferido, se utiliza un modelo no invasivo de los FSAD.

## UN MODELO ANIMAL DE EXCITACION SEXUAL

En los estudios de los presentes autores, se ha desarrollado un modelo reproducible y robusto de la fisiología de la excitación sexual. Este modelo utiliza un conejo anestesiado y emplea tecnologías de láser Doppler para monitorizar el flujo sanguíneo genital registrando rutinariamente los parámetros cardiovasculares. Se pueden medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo vaginal inducido por la estimulación del nervio pélvico o por

PATENTES ... MORENO
MADRID

infusión de VIP en ausencia y en presencia de los agentes de ensayo.

Se cree que dicho modelo animal refleja directamente los datos clínicos. Por ello, este modelo puede utilizarse para estudiar agentes candidatos para el tratamiento de los FSAD, midiendo la estimulación del flujo sanguíneo vaginal.

## MEDIDA FISIOLOGICA DE LA EXCITACION SEXUAL FEMENINA

Según la presente invención, pueden utilizarse una serie de técnicas diferentes para medir el flujo sanguíneo clitorídeo y vaginal. Como ejemplo, puede hacerse uso de fotopletismografía vaginal, técnica de eliminación del calor vaginal, MRI vaginal y clitorídeo de contraste mejorado, imágenes clitorídeas/vulvares por pulsos de láser Doppler y ultrasonografía clitorídea.

La cuantificación de la lubricación vaginal puede medirse también por técnicas conocidas en la técnica, como (a) pesado pre- y post-estimulación de tampones vaginales, y (b) medida del pH del fluido vaginal. Con respecto al último aspecto, el medio ácido normal en reposo en la vagina se hace más alcalino al acercarse al pH de la sangre cuando aparece la trasudación de fluido durante la

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

estimulación sexual.

PDE (fosfodiesterasa)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es una PDE (fosfodiesterasa).

Se sabe que los nucleótidos cíclicos, como cAMP y cGMP, son importantes segundos mensajeros intracelulares. Las nucleótidos cíclicos fosfodiesterasas, también conocidas como PDE, son una familia de enzimas que catalizan la degradación de nucleótidos cíclicos y, al hacerlo, son uno de los componentes celulares que regulan la concentración de nucleótidos cíclicos.

En años recientes, se han definido al menos siete enzimas PDE (como PDEI - PDEVII), así como muchos subtipos de estas enzimas, basándose en la afinidad de sustrato y los requerimientos de cofactores (Beavo, J.A. y Reifsnyder, D.H., Trends Pharmacol. Sci. 11:150 (1990), Beavo, J., en: Cyclic Nucleotides Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action, Beavo, J. y Housley, M.D. (Eds.) Wiley:Chichester, pág. 3-15 (1990).

Ejemplos de PDE incluyen: PDEI que es una PDE dependiente

MORENO
JUAN
13
MADRID

de $Ca^{2+}$/calmodulina, PDEII que es una PDE estimulada por cAMP y cGMP, PDEIII que es una PDE inhibida por cGMP, PDEIV que es una PDE de alta afinidad específica de cAMP y PDEV que es una PDE específica de cGMP. Las PDEI y restantes se denominan a veces PDE de tipo I, y restantes o PDE de tipo 1, y restantes.

Cada familia de PDE puede contener dos o más isoformas (es decir puede haber dos o más isoenzimas PDE). Como ejemplo, la PDEIV de mamífero, la homóloga del gen Dunce de *Drosophila* (Chen, C.N. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (EE.UU.) 83:9313 (1986)) se sabe que tiene cuatro isoformas en rata (Swinnen J.V., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (EE.UU.) 86:5325 (1989)). Se sabe también que las PDE humanas aparecen como isoformas y que tienen variantes de corte y empalme. Por ejemplo, se informó de la clonación de una isoforma humana de PDEIV de monocitos en 1990 (Livi G.P. et al., Mol. Cell. Bio., 10:2678 [1990]). Como otro ejemplo, otros investigadores han clonado independientemente tres variantes de corte y empalme de PDEIV, que se designan ahora como hPDEIV-B1, hPDEIV-B2 y hPDEIV-B3.

Las explicaciones sobre nucleótido cíclico fosfodiesterasas pueden encontrarse también en los documentos US-A-5932423

MADRID

y US-A-5932465.

Las explicaciones sobre otras nucelótido cíclico fosfodiesterasas, es decir CN PCDE8, pueden encontrarse en el documento WO-A-97/35989. Según el documento WO-A-97/35989, la CN PCDE8 tiene dos isoenzimas, que se designaron CN PCDE8A y CN PCDE8B. El término "isoenzima" se refiere a veces en la técnica como "isoforma".

Según el documento WO-A-97/35989, se han identificado muchos inhibidores de diferentes PDE y algunos han experimentado evaluación clínica. Por ejemplo, los inhibidores de PDEIII se están desarrollando como agentes antitrombóticos, como agentes antihipertensivos y como agentes cardiotónicos útiles en el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva. Se ha utilizado rolipram, un inhibidor de PDEIII, en el tratamiento de la depresión y otros inhibidores de PDEIII están sometidos a evaluación como agentes antiinflamatorios. Se ha mostrado que el rolipram inhibe la TNF-alfa inducida por lipopolisacárido (LPS), que se ha mostrado que estimula la replicación de VIH-1 in vitro. Por lo tanto, el rolipram puede inhibir la replicación de VIH-1 (Angel et al., 1995, AIDS 9:1137-44). Además, basándose en su capacidad para suprimir la producción de TNF alfa y beta y del interferón gamma, el rolipram se ha mostrado eficaz en el tratamiento de encefalomielitis, el modelo animal experimental de esclerosis múltiple (Sommer et al., 1995, Nat. Med. 1:244-248) y puede ser eficaz en el tratamiento de disquinesia tardía (Sasaki et al., 1995, Eur. J. Pharmacol. 282:71-76).

Según el documento WO-A-97/35989, existen también inhibidores de PDE no específicos, como teofilina, utilizada en el tratamiento del asma bronquial y otras enfermedades respiratorias, y pentoxifilina, utilizada en el tratamiento de claudicación intermitente y enfermedades vasculares periféricas inducidas por la diabetes. La teofilina se cree que actúa sobre la función del músculo liso de las vías aéreas así como en una capacidad antiinflamatoria o inmunomodulatoria en el tratamiento de enfermedades respiratorias (Banner et al, 1995, Respir. J. 8:996-1000) donde se cree que actúa inhibiendo la hidrólisis tanto de cAMP CN PDE como de cGMP (Banner et al., 1995, Monaldi Arch. Chest. Dis. 50:286-292). La pentoxifilina, también conocida por bloquear la producción de TNF-alfa, puede inhibir la replicación de VIH-1 (Angel et al, supra). Se da una lista de inhibidores de CN PDE en Beavo, 1995, supra.

Se ha sugerido que los inhibidores selectivos de PDE,

MADRID

además de sus isoenzimas y sus isotipos, conducirán a una terapia más eficaz con menos efectos secundarios. Por ejemplo, véanse las explicaciones de las revisiones de Wieshaar R.E., et al., (J. Med. Chem., 28:537[1985]), Giembycz M.A., (Biochem. Pharm., 43:2041 [1992]) y Lowe J.A. y Cheng J.B. (Drugs of the Future, 17:799-807 [1992]).

De esta manera, para algunas aplicaciones es deseable tener una inhibición selectiva de un tipo individual de PDE.

Las explicaciones de los antecedentes sobre las PDE han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a PDE2 o PDE estimulada por cGMP se ha extraído de esa fuente.

> "Los nucleótidos cíclicos funcionan como segundos mensajeros que median una serie de respuestas celulares ante señales extracelulares como hormonas, luz y neurotransmisores. Las nucleótido cíclico fosfodiesterasas (PDE) juegan un papel en la transducción de la señal por regulación de las concentraciones celulares de los nucleótidos cíclicos. Las células de mamíferos contienen múltiples PDE que se distinguen en al menos 7

PATENTES MORENO
MADRID

familias basadas en su afinidad de sustrato y en su sensibilidad selectiva hacia cofactores y medicamentos inhibidores. Estas familias son: (I) PDE dependientes de $Ca^{2+}$/calmodulina, (II) PDE estimuladas por cGMP, (III) PDE inhibidas por cGMP, (IV) PDE específicas de cAMP, (V) PDE específicas de cGMP, (VI) PDE fotoreceptoras y (VII) PDE de alta afinidad específicas de cAMP. A partir de la secuencia de aminoácidos, es evidente que todas estas familias de PDE contienen un dominio relacionado, que se piensa que es el dominio catalítico, con aproximadamente un 30% de identidad de secuencia entre las familias. Los miembros de la misma familia están relacionados más estrechamente, comparten el 60-80% de la identidad de secuencia a lo largo de toda la región de codificación.

Michaeli et al. (1993) establecieron un rastreo funcional altamente sensible para el aislamiento de cDNA que codifica cAMP fosfodiesterasas por complementación de los defectos en la cepa Saccharomyces cerevisiae que carece de ambos genes de cAMP PDE endógenos, PDE1 y PDE2. Se aislaron tres grupos de cDNA correspondientes a 3 genes humanos distintos que codificaban PDE específicas de cAMP a partir de una biblioteca de cDNA de glioblastoma humano utilizando este rastreo funcional. Dos de los genes estaban estrechamente relacionados con la PDE específica de cAMP "dunce" de Drosophila. El tercer gen, al que Michaeli et al. (1993) se refirieron como HCP1, codificaba una nueva PDE específica de cAMP. El HCP1 tenía una secuencia de aminoácidos relacionada con las secuencias de los dominios catalíticos de todas las nucleótido cíclico PDE. Es una PDE de alta afinidad específica de cAMP que no comparte otras propiedades de la familia de PDE específicas de cAMP, sin embargo. La actividad PDE de HCP1 no era sensible a cGMP u otros inhibidores de las PDE inhibibles por cGMP. Las propiedades bioquímicas y farmacológicas de HCP1 sugirieron a Michaeli et al. (1993) que era un miembro de una familia de nucleótido ciclico PDE no descubierta anteriormente, que se designó como la familia VII. Los análisis de transferencia Northern indicaron la presencia de altos niveles de RNA de HCP1 en músculo esquelético humano.

Por análisis de transferencia Southern de líneas celulares híbridas, Milatovich et al. (1994) mapear n el locus de HCP1 en el cromosoma 8, por estudio de las líneas celulares híbridas somáticas que contenían diferentes regiones del cromosoma 8, regionalizaron la asignación de 8q13-q22. Han et al. (1998) mapearon

MORENO AN 13 RID

el gen PDE7A en 8q13 mediante fluorescencia de hibridación in situ. Por análisis retrocruzado interespecífico, mapearon el gen Pde7A de ratón en la región proximal del cromosoma 3."

Las explicaciones de los antecedentes sobre PDE2 han sido presentadas por Jennifer P. Macke et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a PDE2 estimulada por cGMP se ha extraido de esa fuente.

> "Rosman et al. (1997) clonaron un cDNA correspondiente a PDE2A humana. El gen de PDE2A codifica un polipéptido de 941 aminoácidos con una masa molecular prevista de 106 kD. La secuencia de proteína es un 90% idéntica a las secuencias de PDE2A bovina y de rata. El análisis de transferencia Northern mostró que el PDE2A se expresaba como un mRNA de 4,2 kb a niveles variables en todos los tejidos humanos ensayados, con la gran excepción del cerebro. Los estudios de expresión revelaron que la PDE2A hidroliza cAMP y cGMP y es inhibida por el inhibidor EHNA específico de PDE2A."

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de

812

aminoácidos de las PDE están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En un aspecto, la diana de PDE se selecciona de una o más de las siguientes enzimas PDE: $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 1, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 2, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 3, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 4, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 7 y $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 8.

En un aspecto más preferido, la diana de PDE se selecciona de una o más de las siguientes enzimas PDE: $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 1, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 2, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 3 y $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 4.

Preferiblemente, para la presente invención, la PDE para la diana es al menos PDE2.

I:PDE

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:PDE.

Los aspectos amplios de este aspecto de la presente invención se refieren por lo tanto a:

a) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD (preferiblemente

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
ADRID
Teléf. [illegible]

FSAD), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

b) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), siendo el citado agente un I:PDE.

c) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el citado procedimiento el suministro a la hembra de un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

d) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

e) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente un I:PDE.

f) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD) o para prevenir FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un I:PDE.

Otros aspectos de la presente invención comprenden:

A) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

B) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, y siendo el citado agente un I:PDE.

C) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

D) Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, y siendo el citado agente un I:PDE.

E) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un

MORENO
AN
113
MADRID

vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

F) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra y siendo el citado agente un I:PDE.

G) Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de la hembra de modo que produzca un aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), y siendo el citado agente un I:PDE.

Ejemplos de I:PDE se describen en los documentos EP-A-091133 y EP-A-0771799.

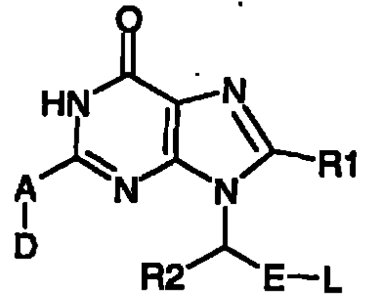
Preferiblemente, el I:PDE es un I:PDE2. Así, los ejemplos de compuestos preferidos son los presentados en el documento EP-A-0771799.

Por conveniencia, la reivindicación 1 del documento EP-A-

MORENO
MAN
113
MADRID

0771799 se repite ahora:

Un derivado de puri-6-ona de fórmula general (I):



en la que

| | |
|---|---|
| $R^1$ | representa hidrógeno o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono, |
| $R^2$ | representa un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono opcionalmente sustituido con hidroxilo, azido o un grupo de fórmula $-NR^3R^4$ o $-OSO_2R^5$, en la que |
| $R^3$ y $R^4$ | son idénticos o diferentes y representan un cicloalquilo que contiene de 3 a 6 átomos de carbono, hidrógeno, formilo o un alquilo |

FATIMA ... MORENO

818

lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con un alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado, conteniendo respectivamente hasta 6 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $-(CO)_a-NR^6R^7$, en la que

a es el número 0 o 1,

$R^6$ y $R^7$ son idénticos o diferentes y representan hidrógeno, formilo, hidroxilo, fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con hidroxilo o un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, o

$R^3$ y/o $R^4$ representan un alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, un carboxilo o un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido con hidroxilo o un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, o

$R^3$ y/o $R^4$ representan un residuo de fórmula $-(CO)_b-T-NR^8R^9$, $-CO-R^{10}$, $-SO_2R^{11}$ o $-SO_2NR^{12}R^{13}$, en el que

b tiene el significado dado anteriormente para a y es idéntico a éste o diferente de

MORENO
MADRID

| | |
|---|---|
| | éste. |
| T | puede representar un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, o cuando b no es 0, puede representar también un enlace, |
| $R^8$ y $R^9$ | tienen el significado dado para los $R^6$ y $R^7$ anteriores y son idénticos a éstos o diferentes de éstos, |
| $R^{10}$ | representa un heterociclo saturado, parcialmente saturado o insaturado de 5 a 7 miembros que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, que también puede estar opcionalmente sustituido en la función N con un alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, carboxilo, benciloxicarboxilo o hidroxilo, |
| $R^{11}$ | representa un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, bencilo o fenilo, |
| $R^{12}$ y $R^{13}$ | son idénticos o diferentes y representan hidrógeno, fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, o |

[illegible] MORENO [illegible] RID Tel. [illegible]

| | |
|---|---|
| $R^3$ y $R^4$ | junto con el átomo de nitrógeno forman un heterociclo saturado, parcialmente saturado o insaturado de 5 ó 6 miembros que puede contener hasta 3 heteroátomos seleccionados de N, S y/o O o un residuo $-NR^{14}$, y que está opcionalmente sustituido con carbonilo, un alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono que a su vez puede estar sustituido con hidroxilo, carboxi o un acilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contienen respectivamente hasta 6 átomos de carbono, en la que |
| $R^{14}$ | representa hidrógeno, carbonilo o un alquilo o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 5 átomos de carbono, y |
| $R^5$ | representa fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, |
| A | representa una cadena alquileno o alquenileno lineal o ramificada que contiene respectivamente hasta 6 átomos de |

MADRID

carbono,

D y L son idénticos o diferentes y representan un arilo que contiene de 6 a 10 átomos de carbono o un heterociclo aromático de 5 a 7 miembros, opcionalmente benzocondensado, que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, opcionalmente sustituido hasta 3 veces con sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre halógeno, hidroxilo, nitro, trifluorometilo, carboxi, alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 6 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $-(V)_c-NR^{15}R^{16}$ y/o $-OR^{17}$, en la que

c es el número 0 ó 1,

V representa un residuo de fórmula -CO o $-SO_2$,

$R^{15}$ y $R^{16}$ son idénticos o diferentes y tienen el significado dado para $R^3$ y $R^4$ anteriormente,

$R^{17}$ representa hidrógeno, un alquenilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono, opcionalmente sustituido hasta 3 veces con

MORENO
MADRID

sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre hidroxilo, carbonilo o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, y/o los ciclos están opcionalmente sustituidos con un arilo que contiene de 6 a 10 átomos de carbono o con un heterociclo aromático de 5 a 7 miembros, opcionalmente condensado a benceno, que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, que está a su vez opcionalmente sustituido hasta dos veces con sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre halógeno, hidroxilo, nitro, carboxilo, trifluorometilo o un alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 5 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $(V')_d$-$NR^{18}R^{19}$, en la que

d tiene el significado dado anteriormente para a y es idéntico a éste o diferente de éste,

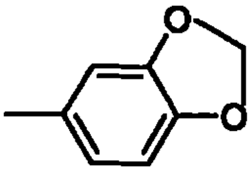
$R^{18}$ y $R^{19}$ tienen el significado dado anteriormente para $R^3$ y $R^4$ y son idénticos a éstos o diferentes de éstos,

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] Y [illegible]AN
[illegible] 13
[illegible] MADRID

823

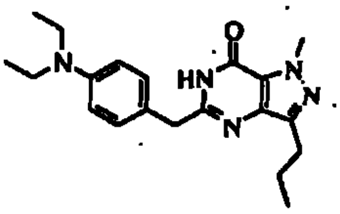
| | |
|---|---|
| V' | tiene el significado dado anteriormente para V y es idéntico a éste o diferente de éste, y/o |
| | representa el sistema de anillo dado a continuación para D, opcionalmente sustituido con un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con hidroxilo, un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $-NR^{20}R^{21}$, en la que |
| $R^{20}$ y $R^{21}$ | son idénticos o diferentes y tienen el significado dado anteriormente para $R^3$ y $R^4$, |
| | o |
| E | representa un residuo de fórmula $-CH_2-Y-Z$, en la que |
| Y | representa un enlace o un átomo de oxígeno o azufre o el grupo -NH-, |
| Z | representa una cadena alquilo lineal o ramificada que contiene hasta 5 átomos de carbono, |
| D | representa un residuo de fórmula |

MORENO
ALEMAN
13
MADRID

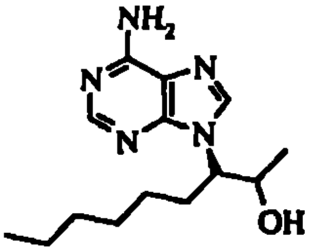
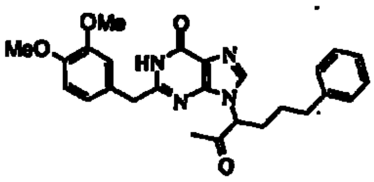
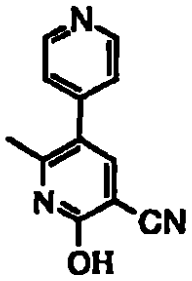


y tautómeros y sales de éste.

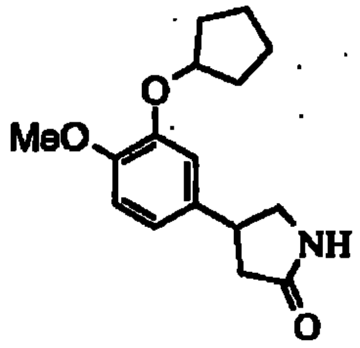
Los I:PDE preferidos se seleccionan de las siguientes estructuras:

| Compuesto | Estructura | Modo de acción<br>Referencias |
|---|---|---|
| FIa |  | I:PDEI<br>EP-A-091133<br>(ejemplo 50) |

PATRICIA [illegible] MORENO [illegible] MADRID

| | | |
|---|---|---|
| FIb |  | I:PDE2<br>EHNA (también un inhibidor de adenosíndesaminasa) |
| FII |  | I:PDE2<br>EP-A-0771799<br>(ejemplo 100) |
| FIII |  | I:PDE3<br>Milrinona<br>(que está comercialmente disponible) |

113 MADRID

| | | |
|---|---|---|
| FIV |  | I:PDE4<br>Rolipram<br>(que está comercialmente disponible) |

NEP (endopeptidasa neutra)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es NEP.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de NEP están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En un aspecto, NEP es NEP (EC 3.4.24.11) (también conocida como encefalinasa o endopeptidasa-2). En este caso, se han encontrado mRNA de NEP EC 3.4.24.11 y proteína expresada en vagina humana y de conejo.

En este caso, creemos que en las hembras, incluyendo las

que sufren FSAD, se degrada el VIP por la NEP EC3.4.24.11. De esta manera, los inhibidores de NEP potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del VIP liberado durante la excitación. Esto conducirá a un tratamiento de los FSAD, tal como por medio de un aumento de la congestión vaginal. Se ha mostrado que los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 estimulan los aumentos del flujo sanguíneo genital vaginal estimulado por el nervio pélvico e inducidos por VIP. Además, esos inhibidores selectivos de NEP estimulan la relajación mediada por VIP y por los nervios de la pared vaginal aislada.

Las explicaciones de los antecedentes de NEP han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a NEP se ha extraído de esa fuente.

> "El antígeno de la leucemia linfocítica aguda común es un marcador de superficie celular importante en el diagnóstico de la leucemia linfocítica aguda humana (ALL). Está presente en células leucémicas de fenotipo pre-B, que representan el 85% de los casos de ALL. La CALLA no está restringido sin embargo a las células leucémicas, y se encuentra en una serie

[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible]RID
Telf. [illegible]

de tejidos normales. La CALLA es una glicoproteína que es particularmente abundante en riñón, donde se presenta en el borde de cepillo de los túbulos proximales y en el epitelio glomerular. Letarte et el. (1988) clonaron un cDNA que codificaba CALLA y mostraron que la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de cDNA es idéntica a la de la endopeptidasa neutra humana asociada a membrana (NEP, EC 3.4.24.11), también conocida como encefalinasa. La NEP corta los péptidos en el extremo amino de los residuos hidrofóbicos e inactiva diversas hormonas peptídicas, incluyendo glucagón, encefalina, sustancia P, neurotensina, oxitocina y bradiquinina. Por análisis de transfección de cDNA, Shipp et al. (1989) confirmaron que CALLA es una endopeptidasa neutra funcional del tipo denominado anteriormente encefalinasa. Barker et al. (1989) demostraron que el gen CALLA, que codifica una glicoproteína transmembrana de tipo II de 100 kD, existe en una sola copia de más de 45 kD que no está reordenada como CALLA de superficie celular que expresa malignidades. Se localizó el gen en el cromosoma humano 3 por estudio de los híbridos celulares somáticos e hibridación in situ regionalizada en la localización 3q21-q27. Tran-Paterson et al. (1989)

asignaron también el gen al cromosoma 3 por análisis de transferencia Southern de DNA de híbridos celulares somáticos humano-roedor. D'Adamio et al. (1989) demostraron que el gen CALLA abarca más de 80 kb y está compuesto por 24 exones".

I:NEP

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:NEP.

Los aspectos amplios de este aspecto de la presente invención por lo tanto se refieren a:

a) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

b) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), siendo el citado agente un I:NEP.

MORENO
MADRID

c) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el citado procedimiento el suministro a la hembra de un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

d) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

e) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente un I:NEP.

f) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD) o para prevenir FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un I:NEP.

Otros aspectos de la presente invención comprenden:

A) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

B) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, y siendo el citado agente un I:NEP.

C) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

[illegible] MORENO [illegible] MADRID

D) Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, y siendo el citado agente un I:NEP.

E) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

F) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra y siendo el citado agente un I:NEP.

G) Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de la hembra de modo que produzca un aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), y siendo el citado agente un I:NEP.

Los detalles de un sistema de ensayo adecuado para identificar y/o estudiar un I:NEP se presentan en la siguiente sección.

Los I:NEP se discuten en los siguientes artículos de revisión:

Pathol. Biol., 46(3), 1998, 191.
Curent Pharm. Design, 2(5), 1996, 443.
Biochem. Soc. Trans., 21(3), 1993, 678.
Handbook Exp. Pharmacol., 104/1, 1993, 547.
TiPS, 11, 1990, 245.
Pharmacol Rev., 45(1), 1993, 87.
Curr. Opin. Inves. Drugs, 2(11), 1993, 1175.
Antihypertens. Drugs, (1997), 113.
Chemtracts, (1997), 10(11), 804.
Zinc Metalloproteases Health Dis. (1996), 105.
Cardiovasc. Drug. Rev., (1996), 14(2), 166.

Gen. Pharmacol., (1996), 27(4), 581.

Cardiovasc. Drug Rev., (1994), 12(4), 271.

Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., (1995), 22(1), 63.

Cardiovasc. Drug Rev., (1991), 9(3), 285.

Exp. Opin. Ther. Patents (1996), 6(11), 1147.

Se describen I:NEP en los siguientes documentos:

EP-509442A
US-192435
US-4929641
EP-599444B
US-884664
EP-544620A
US-798684
J. Med. Chem. 1993, 3821.
Circulation 1993, 88(4), 1.
EP-136883
JP-85136554
US-4722810
Curr. Pharm. Design, 1996, 2, 443.
EP-640594
J. Med. Chem. 1993, 36(1), 87.
EP-738711-A
JP-270957

[illegible] MADRID

CAS nº 115406-23-0

DE-19510566

DE-19638020

EP-830863

JP-98101565

EP-733642

WO9614293

JP-08245609

JP-96245609

WO9415908

JP05092948

WO-9309101

WO-9109840

EP-519738

EP-690070

J. Med. Chem. (1993), 36, 2420.

JP-95157459

Bioorg. Med. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65.

Los I:NEP preferidos se describen en los siguientes documentos:

EP-A-0274234

JP-88165353

Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, 164, 58

PATRICIA [illegible]

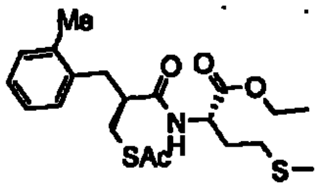
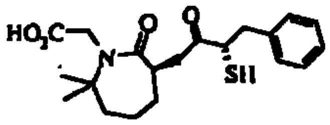
EP-629627-A

US-77978

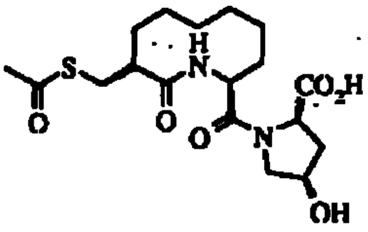
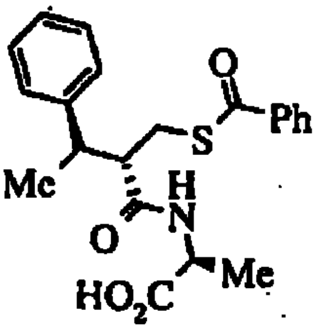
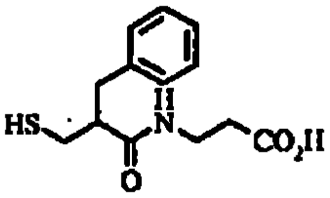
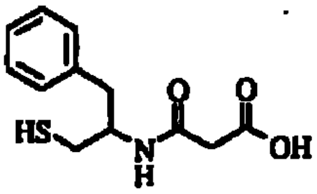
Perspect. Med. Chem. (1993), 45.

EP-358398-B

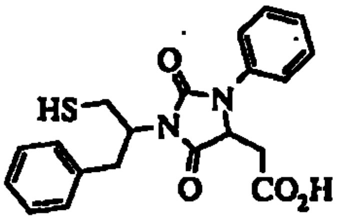
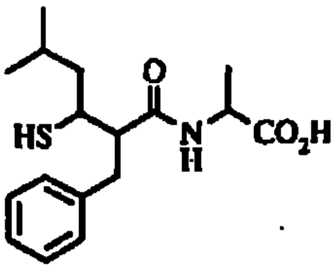
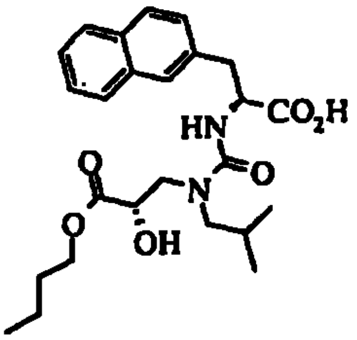
Los ejemplos preferidos de I:NEP se seleccionan de las siguientes estructuras:

| Compuesto | Estructura | Modo de acción<br>Referencias |
|---|---|---|
| FXII |  | I:NEP<br>EP-509442A<br>US-192435<br>US-4929641 |
| FXIII |  | I:NEP<br>(también inhibidor de ACE)<br>EP-599444B<br>US-884664 |

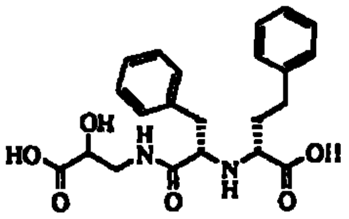
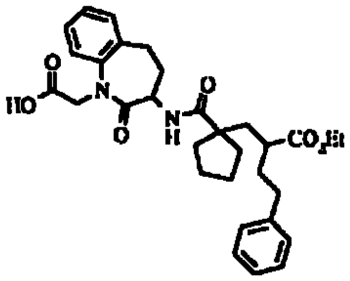
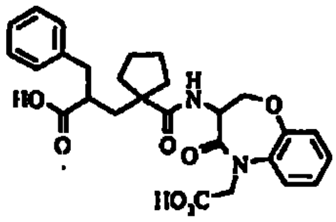
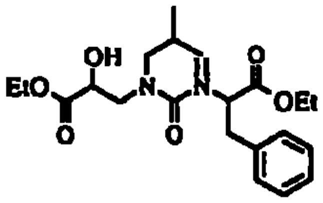
PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES [illegible] AN
c. [illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

| | | |
|---|---|---|
| FXIV |  | I:NEP<br>EP-544620A<br>Us-798684<br>J. Med. Chem.<br>1993, 3821 |
| FXV |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>Mixanpril<br>Circulation 1993,<br>8(4), 1 |
| FXVI |  | I:NEP<br>EP-136883<br>JP-85136554<br>US-4722810 |
| FXVII |  | I:NEP<br>Retrothiorphan<br>Curr. Pharm.<br>Design, 1996, 2,<br>443. |

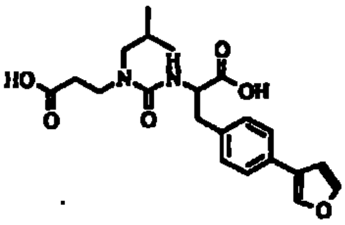
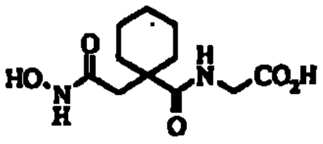
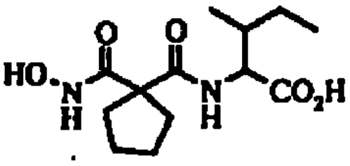
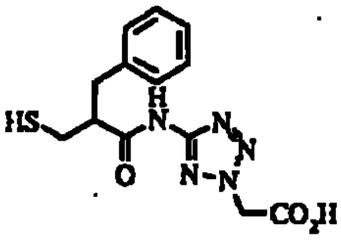
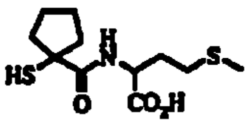
MORENO
MAN
113
DRID
Tel.

| | | |
|---|---|---|
| FXVIII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>EP-640594 |
| FXIX |  | I:NEP<br>J. Med. Chem. 1993, 36(1), 87 |
| FXX |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>EP-738711-A<br>JP-270957 |

MORENO
13
MADRID

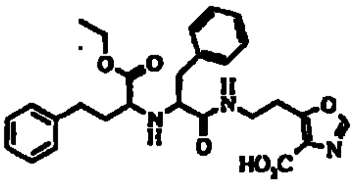
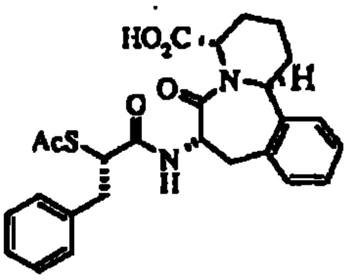
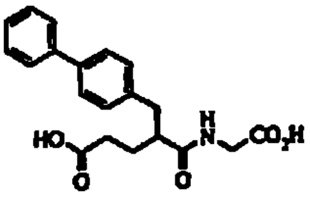
| | | |
|---|---|---|
| FXXI |  | I:NEP<br>n° CAS 115406-23-0 |
| FXXII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>DE-19510566<br>DE-19638020<br>EP-830863<br>JP-98101565 |
| FXXIII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>EP-733642 |
| FXXIV |  | I:NEP<br>WO96/14293 |

MORENO
...AN
...13
...ADRID
Teléf.

| | | |
|---|---|---|
| FXXV |  | I:NEP<br>JP-08245609<br>JP-96245609 |
| FXXVI |  | I:NEP<br>WO9415908 |
| FXXVII |  | I:NEP<br>JP5092948 |
| FXXVIII |  | I:NEP<br>WO-9309101 |
| FXXIX |  | I:NEP<br>WO-9109840 |

FATIMA ... MORENO
... MAN
... RID

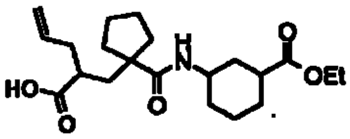
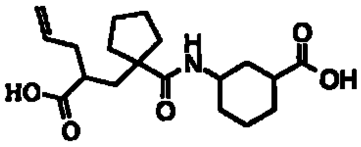
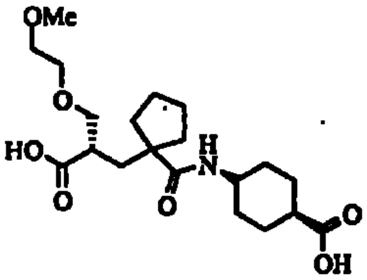
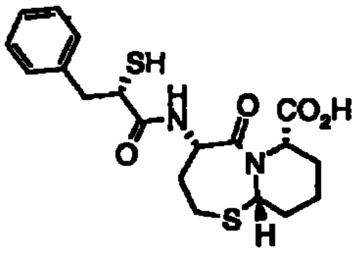
841

| | | |
|---|---|---|
| FXXXI |  | I:NEP<br>EP-519738<br>EP-690070 |
| FXXXII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>J. Med. Chem. (1993), 36, 2420. |
| FXXXIII |  | I:NEP<br>JP-95157459<br>Bioorg. MEd. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65 |

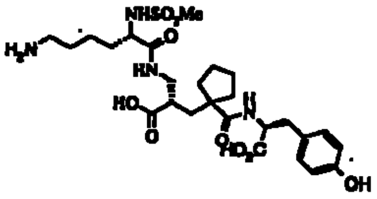
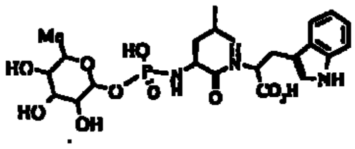
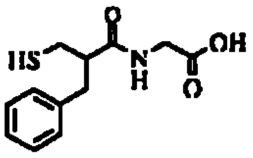
Los I:NEP más preferidos se seleccionan de las siguientes estructuras:

| Compuesto | Estructura | Modo de acción<br>Referencias |
|---|---|---|

[illegible] MORENO
[illegible]
[illegible] 13
[illegible]RID

| | | |
|---|---|---|
| FV |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(ejemplo 300) |
| FVI |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(ejemplo 379) |
| FVII |  | I:NEP<br>Candoxatrilat<br>EP-274234<br>JP-88165353<br>Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, 164, 58. |
| FVIII |  | I:NEP<br>Omapatrilat<br>(también un inhibidor de ACE)<br>EP-0629627-A<br>US-77978 |

PAT [illegible] MORENO
ING [illegible] MAN
[illegible] RID
Teléf.

| | | |
|---|---|---|
| FIX |  | I:NEP<br>Sampatrilat<br>(también un inhibidor de ACE)<br>Perspect. Med. Chem. (1993), 45.<br>EP-0358398-B |
| FX |  | I:NEP<br>Fosforamidón<br>(que está comercialmente disponible) |
| FXI |  | I:NEP<br>Tiorfano<br>(que está comercialmente disponible) |

## ENSAYO NEP

PREPARACION Y ENSAYO DE ENDOPEPTIDASA NEUTRA (NEP) SOLUBLE DE CORTEZA RENAL CANINA, DE RATA, DE CONEJO Y HUMANA.

Se obtiene la NEP soluble de corteza renal y se ensaya la

MORENO
MADRID

actividad midiendo de la tasa de ruptura del sustrato NEP Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp para generar su producto fluorescente Abz-D-Arg-Arg.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1. MATERIALES

Toda el agua se ha desionizado dos veces.

### 1.1. Tejidos

| | |
|---|---|
| Riñón humano | IIAM (Pennsylvania, EE.UU.) |
| Riñón de rata | Suministro de tejido propio |
| Riñón de conejo | Suministro de tejido propio |
| Riñón canino | Suministro de tejido propio |

### 1.2. Medio de homogeneización

Manitol 100 mM y Tris 20 mM a pH 7,1

2,42 g de Tris (Fisher T/P630/60) se diluyen en 1 litro de agua y se ajusta el pH a 7,1 utilizando HCl 6 M a temperatura ambiente. Se añade a ésto 18,22 g de manitol (Sigma M-9546).

### 1.3. Tampón tris (tampón NEP)

50 ml de Tris 50 mM a pH 7,4 (Sigma T2663) se diluyen en 950 ml de agua.

[illegible]

845

### 1.4. Sustrato (Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp)

Preparado por encargo en SNPE, almacenado en forma de polvo a -20°C. Se prepara una disolución madre 2 mM por resuspensión suave del sustrato en tampón Tris, éste no debe agitarse con vórtice ni sonicarse.

Se almacenan alícuotas de 600 µl de disolución madre 2 mM a -20 °C durante hasta un mes.

### 1.5. Producto total

Se incluyen en la placa muestras correspondientes a un 100% de conversión de sustrato a producto para posibilitar la determinación del % de producción del sustrato. Se genera el producto total por incubación de 1 ml de sustrato 2 mM con 20 µl de disolución madre de enzima durante 24 horas a 37°C.

### 1.6. Disolución de parada.

Se prepara una disolución madre 300 µM de fosforamidón (Sigma R7385) en tampón NEP y se almacena en alícuotas de 50 µl a -20°C.

1.7 Dimetilsulfóxido (DMSO)

1.8 Cloruro de magnesio, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Fisher M0600/53).

1.9 Placas de ensayo de fondo plano de 96 pocillos

PAT... MORENO
... MADRID
Telf. ...

negras (Costar 3915).

1.10 Topseal A (Packard 6005185).

1.11. Tubos de centrífuga

## 2. EQUIPAMIENTO ESPECIFICO

2.1 Centrífuga Sorvall RC-5B (rotor SS34 GSA, preenfriada a 4°C).

2.2 mezclador Miniprimer Braun

2.3 Centrífuga Beckman CS-6R.

2.4 Fluostar galaxy

2.5 Incubador de agitación Wesbart 1589.

## 3. PROCEDIMIENTOS

### 3.1 PREPARACION DE TEJIDOS

3.2 Se obtienen NEP de perro, rata, conejo, y humana de corteza renal utilizando un procedimiento adaptado de Booth, A.G. & Kenny, A.J. (1974) *Biochem J.*, 142, 575-581.

3.3 Se dejan descongelar los riñones congelados a temperatura ambiente y se extraen las cortezas de la médula.

3.4 Se corta finamente en láminas la corteza y se homogeneiza en aproximadamente 10 volúmenes de tampón de homogeneización (1.2) utilizando un homogeneizador Braun (2.2).

3.5 Se añade cloruro de magnesio (1.8) (20,3 mg/g de tejido) al homogeneizado y se agita en baño de hielo durante 15 minutos.

3.6 Se centrifuga el homogeneizado a 1.500 g (3.820 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman (2.3) antes de extraer el sobrenadante a un tubo de centrífuga nuevo y descartar el sedimento.

3.7 Se centrifuga el sobrenadante a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Sorvall (2.1) y se descarta el sobrenadante.

3.8 Se extrae la capa rosa pálido de encima del sedimento restante y se resuspende en tampón de homogeneización que contiene cloruro de magnesio (9 mg de $MgCl_2$ en 5 ml de tampón por g de tejido).

3.9 Se centrifuga la suspensión a 2.200 g (4.630 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman (2.3) antes de descartar el sedimento.

3.10 Se centrifuga la suspensión a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos utilizando la centrífuga Sorvall (2.1) y se descarta el sobrenadante.

3.11 Se resuspende el sedimento final en tampón de homogeneización que contiene cloruro de magnesio (0,9 mg de $MgCl_2$ en 0,5 ml de tampón por g de tejido). Se obtiene una suspensión homogénea utilizando el mezclador Miniprimer Braun (2.2). Esta se congela a continuación en alícuotas de 100 $\mu$l para ensayar la actividad NEP.

## 4.0 DETERMINACION DE ACTIVIDAD NEP

Se mide la actividad de la NEP previamente dispuesta en alícuotas en función de su capacidad para cortar el sustrato peptídico específico de NEP.

4.1 Se prepara una disolución de DMSO al 4%/tampón NEP (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón NEP).

4.2 Se dejan las disoluciones madre de sustrato, producto total, enzima y fosforamidón en hielo para descongelar.

4.3 Se añaden 50 µl de disolución de DMSO al 4%/tampón NEP a cada pocillo.

4.4 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:40 para preparar una disolución 50 µM. Se añaden 100 µl de sustrato 50 µM a cada pocillo (concentración final 25 µM).

4.5 Se añaden 50 µl de un intervalo de diluciones de enzimas para iniciar la reacción (habitualmente se utilizan 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200). Se añaden 50 µl de tampón NEP a los pocillos blanco.

4.6 Se diluye el producto total 2 mM 1:80 para preparar una disolución 25 µM. Se añaden 200 µl de producto 25 µM a los cuatro primeros pocillos de una placa nueva.

4.7 Se incuban las placas a 37°C en un incubador de

MORENO
MADRID
Teléf.

agitación durante 60 minutos.

4.8 Se diluye la disolución madre 300 μM de fosforamidón 1:100 a 300 nM. Se para la reacción por adición de 100 μl de fosforamidón 300 nM y se incuba a 37°C en un incubador de agitación durante 20 minutos antes de leer en un Fluostar (ex320, em420).

## 5. ENSAYOS DE INHIBICION DE NEP

5.1 Se dejan las disoluciones madre de sustrato, producto total, enzima y fosforamidón en hielo para descongelar.

5.2 Se preparan disoluciones madre del compuesto con DMSO al 100% y se diluyen 1:25 en tampón NEP proporcionando una disolución de DMSO al 4%. Todas las demás diluciones se llevan a cabo en disolución de DMSO al 4% (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón NEP).

5.3 Se añaden 50 μl de compuesto por duplicado a la placa de 96 pocillos y se añaden 50 μl de DMSO al 4%/tampón NEP a los pocillos de control y a los pocillos blanco.

5.4 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:40 en tampón NEP preparando una disolución 50 μM (275 μl de sustrato 2 mM para 10,73 ml de tampón es suficiente para una placa).

5.5 Se diluye la disolución madre de enzima en tampón

MORENO
MADRID

NEP (determinado por las comprobaciones de actividad).

5.6 Se diluye la disolución madre de producto total 2 mM 1:80 en tampón NEP para preparar una disolución 25 µM. Se añaden 200 µl a los primeros cuatro pocillos de una placa por separado.

5.7 Se diluye la disolución madre de fosforamidón 300 µM 1:1000 para preparar una disolución madre 300 nM (11 µl de fosforamidón para 10,99 ml de tampón NEP).

5.8 Se añade a cada pocillo de la placa de 96 pocillos lo siguiente:

Tabla de reactivos a añadir a la placa de 96 pocillos.

| | Compuesto /DMSO | Tampón Tris | Sustrato | Enzima NEP | Producto total |
|---|---|---|---|---|---|
| Muestras | 2 µl de compuesto | 50 µl | 100 µl | 50 µl | Nada |
| Controles | 2 µl de DMSO | 50 µl | 100 µl | 50 µl | Nada |
| Blancos | 2 µl de DMSO | 100 µl | 100 µl | Nada | Nada |
| Totales | 2 µl de DMSO | Nada | Nada | Nada | 200 µl |

PATENTES ... MORENO
MADRID

5.9 Se inicia la reacción por adición de la enzima NEP antes de incubar a 37°C durante 1 hora en un incubador de agitación.

5.10 Se para la reacción con 100 µl de fosforamidón 300 nM y se incuba a 37°C durante 20 minutos en un incubador de agitación antes de leer en el Fluostar (ex320/em420).

## 6. CALCULOS

Se determina la actividad de la enzima NEP en presencia y en ausencia del compuesto y se expresa como un porcentaje.

% de actividad control (rendimiento de la enzima)

$$\frac{\text{FU medias de los controles - FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales - FU medias de los blancos}} \times 100$$

% de actividad con inhibidor

$$\frac{\text{FU medias del compuesto - FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales - FU medias de los blancos}} \times 100$$

MORENO
MADRID

Actividad expresada como % del control:

$$\frac{\%\ \text{actividad con inhibidor}}{\%\ \text{actividad del control}} \times 100$$

Se ajusta una curva de dosis-respuesta sigmoidal para el % de actividades (% de control) frente a la concentración de compuesto y se calculan los valores de CI50 utilizando el ajuste de curvas LabStats en Excel.

NPY (neuropéptido Y)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es NPY o uno de sus receptores asociados.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de NPY y sus receptores están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En este caso, se ha encontrado que el neuropéptido Y (NPY) ejerce una influencia reguladora inhibidora sobre la vasorrelajación mediada por el péptido intestinal vasoactivo (VIP). De esta manera, la inhibición de los receptores NPY dará como resultado un aumento del flujo sanguíneo vaginal mediado por el VIP y el nervio pélvico, es decir, anular las barreras a la vasorrelajación. Clínicamente, esto conducirá a un aumento de la congestión vaginal que conducirá en último término a un aumento de la lubricación a través de trasudación de plasma y a un aumento de la flexibilidad vaginal. Por ello, una diana adecuada para el tratamiento de los FSAD es NPY o uno de sus receptores asociados.

Así, en un aspecto preferido, el agente es un antagonista de NPY $Y_1$, $Y_2$ o $Y_5$, preferiblemente un antagonista oral de NPY $Y_1$, $Y_2$ o $Y_5$. Este agente tratará el FSAD aumentando el flujo sanguíneo vaginal y aumentando la lubricación.

El antagonismo mediado por NPY de los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo representa, por lo tanto, una diana terapéutica potencial mediante la cual el flujo sanguíneo en el tracto genital femenino puede ser influenciado. El mecanismo a través del cual aparece este antagonismo es muy probablemente a través de activación $G_{i/o}$ inducida por el receptor NPY $Y_1$. En otros sistemas fisiológicos, los receptores NPY $Y_1$ han sido implicados en la mediación de la vasoconstricción y en la inhibición de la liberación de transmisores simpáticos (Lundberg et al., 1996, no puede excluirse un efecto de NPY $Y_2$). Se cree que

[illegible] MORENO
[illegible] RID

el NPY inhibe la vasorrelajación en el tracto genital femenino mediante la inhibición directa de la adenilato ciclasa que inhibe directamente la liberación de VIP o la neurotransmisión simpática.

Como se ha indicado, un objetivo $P_{cAMP}$ es uno de los receptores NPY.

La liberación neuronal de NPY regula la vasorrelajación inducida por VIP del lecho vascular vaginal. Esto ocurre muy probablemente a través de un mecanismo presináptico que implica a los receptores NPY $Y_1$, aunque no puede excluirse un modo de acción post-sináptico. Un antagonista de NPY potenciará la vasodilatación inducida por VIP del lecho vascular vaginal. Clinicamente, esto conducirá a un aumento de la lubricación y de la flexibilidad vaginal a través de la congestión de la pared vaginal.

Los estudios de expresión del receptor NPY realizados por los presente autores han identificado los subtipos de receptor NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$ dentro de la vagina humana.

Por ello, en un aspecto, la diana $P_{cAMP}$ es uno o más de los subtipos de receptores NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$.

[illegible] MADRID

Las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a NPY se ha extraído de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY) es un péptido abundante y ampliamente extendido en el sistema nervioso de los mamíferos. Muestra homología de secuencia con el péptido YY y por encima del 50% de homología en la secuencia de aminoácidos y en la secuencia de nucleótidos con el polipéptido pancreático (PNP, 167780). El NPY es un péptido de 36 aminoácidos. Minth et al. (1984) clonaron el gen de NPY partiendo de mRNA de feocromocitoma. Takeuchi et al. (1985, 1986) aislaron clones de cDNA de los genes NPY y PNP a partir de un feocromocitoma y un tumor endocrino pancreático, respectivamente. Utilizando estas sondas de cDNA para analizar el DNA genómico de paneles de asignación cromosómica de híbridos celulares somáticos humano-ratón, examinaron después la cuestión de si los genes son sinténicos. Los estudios no mostraron sintenia, con NPY en 7pter-7q22 y con PNP en 17p11.1-17qter. Por estudios de retrocruzamiento con Mus spretus, Bahary et al. (1991) mapearon el gen homólogo de NPY en el cromosoma 6 de ratón. Puesto que el cromosoma 6 tiene homología con el 7q humano, es probable que el gen NPY en humano esté localizado en la región 7cen-q22. Meisler et al. (1987) excluyeron ligamientos cercanos entre los loci de la fibrosis cística (219700) y el neuropéptido Y. Terenghi et al. (1987) determinaron la distribución del mRNA que codifica el NPY en neuronas de la corteza cerebral en especímenes de biopsia quirúrgica y cerebro postmortem por medio de técnicas de hibridación in situ. Mostraron una localización consistente de la transcripción y expresión del gen NPY en neuronas corticales maduras normales. Baker et al. (1995) mostró por fluorescencia de hibridación in situ que el gen NPY está localizado en 7p15.1 y que existe en una sola copia. Comentaron que el NPY es uno de los péptidos más conservados conocidos con, por ejemplo, sólo 3 aminoácidos de diferencia entre humano y tiburón. El neuropéptido Y es un neuromodulador implicado en el control del equilibrio de energía y se sobreproduce en el hipotálamo de ratones ob/ob. Para determinar el papel de NPY en la respuesta a la deficiencia de leptina (164160), Erickson et al. (1996) generaron ratones ob/ob deficientes en NPY. En ausencia de NPY, los ratones ob/ob eran menos obesos debido a una menor ingestión de alimento y un mayor gasto de energía, y estaban afectados con una menor gravedad por diabetes, esterilidad y defectos somatrópicos. Estos resultados se interpretaron como indicadores de que NPY es un efector central de la deficiencia de leptina. Los análisis de ligamiento genético de ratas que se criaron selectivamente para mostrar una preferencia por el alcohol, identificaron una región cromosómica que incluía el gen NPY (Carr et al., 1998). Las ratas que prefieren alcohol tuvieron niveles menores de NPY en diversas regiones cerebrales comparadas con las ratas que no prefieren alcohol. Thiele et al. (1998) estudiaron por lo tanto el consumo de alcohol en ratones que carecían completamente de NPY como resultado de una alteración dirigida del gen (Erickson et al., 1996). Encontraron que los ratones deficientes en NPY mostraban un aumento del consumo, comparado con las ratones de tipo silvestre, de disoluciones que contenían etanol al 6%, 10% y 20% (en volumen). Los ratones deficientes en NPY eran también menos sensibles a los efectos sedantes/hipnóticos del etanol, como mostró una recuperación más rápida del sueño inducido por etanol, incluso aunque los niveles de etanol en plasma no diferían significativamente de los de los controles. En contraposición, los ratones transgénicos que sobreexpresaron un gen NPY marcado en neuronas que habitualmente lo expresan, tuvieron una menor preferencia por el alcohol y fueron más sensibles a los efectos sedantes/hipnóticos del etanol que los controles. Estos datos proporcionaron evidencias directas de que el consumo de alcohol y la resistencia son inversamente proporcionales a los niveles de NPY en el cerebro. Como parte de un estudio en marcha sobre la base genética de la obesidad, Karvonen et al. (1998) identificaron un polimorfismo 1128T-C que resultaba de la sustitución de leucina por prolina en el residuo 7 de la parte péptido señal de pre-pro-NPY. Este polimorfismo no estaba asociado a la obesidad o al metabolismo energético, pero estaba significativa y consistentemente asociado a altos niveles de colesterol total y colesterol LDL en suero tanto en sujetos finlandeses de peso normal y obesos como en holandeses obesos. Uusitupa et al. (1998) encontró el polimorfismo pro7 en el 14% de los finlandeses, pero sólo en el 6% de los holandeses. Los sujetos con pro7 en NPY tenían, de media, niveles de colesterol total en suero de 0,6 a 1,14 mmol/l mayores que aquellos sin esta variante del gen. Puesto que el impacto de pro7 NPY sobre los niveles de colesterol en suero no pudieron encontrarse en holandeses de peso normal, puede suponerse que las personas obesas son más susceptibles al efecto de la variante del gen. Se calculó que la probabilidad de tener el pro7 en NPY podría ser del orden del 50 o del 60% en sujetos obesos con un colesterol total en suero igual o superior a 8 mmol/l. Al menos entre los finlandeses, la forma pro7 de NPY es uno de los factores genéticos más potentes que afectan a los niveles de colesterol en suero. Véase también Allen y Bloom (1986), Dockray (1986), Maccarrone y Jarrott (1986), Minth et al. (1986)".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A: McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a NPYR1 se ha extraido de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY, 162640) es uno de los neuropéptidos más abundantes en el sistema nervioso mamífero y exhibe un variado intervalo de actividades fisiológicas importantes, incluyendo efectos sobre la

MORENO
MAN
113
ADRID

actividad psicomotriz, ingestión de alimento, regulación de la secreción endocrina central y potentes efectos vasoactivos sobre el sistema cardiovascular. Se han definido dos grandes subtipos de NPY (Y1 e Y2) por criterios farmacólogicos. Los receptores NPY Y1 se han identificado en una serie de tejidos, incluyendo cerebro, bazo, intestino delgado, riñón, testículos, placenta y músculo liso aórtico. El receptor Y2 se encuentra principalmente en el sistema nervioso central. Herzog et al. (1992) informaron de haber clonado un cDNA que codificaba un receptor de NPY humano del que confirmaron que era un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G. Cuando se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón embrionario humano, el receptor exhibió características de especificidad de ligando. En la línea celular de riñón, el receptor se acopló a una proteína G sensible a la toxina pertussis que mediaba la inhibición de la acumulación de AMP cíclico. En la línea celular CHO, por otro lado, el receptor no se acopló a la inhibición de la adenilato ciclasa, sino a la elevación del calcio intracelular. De esta manera, el acoplamiento de segundo mensajero del receptor NPY era específico del tipo celular,

MORENO JUAN 113 MADRID

dependiendo del repertorio específico de proteínas G y de sistemas efectores presentes en el tipo de célula. Larhammar et al. (1992) clonaron independientemente y caracterizaron el receptor de neuropéptido Y. Herzog et al. (1993) determinaron la organización molecular y la regulación del gen del receptor de NPY Y1. En contraposición con la estructura contigua de la mayoría de los genes del receptor acoplados a proteína G, encontraron que el gen del receptor de NPY Y1 tiene 3 exones. Identificaron también un polimorfismo Pstl común en el primer intrón del gen. Por hibridación in situ con fluorescencia de alta resolución, localizaron el gen en 4q31.3-q32. Herzog et al. (1997) encontraron que los genes NPY1R y NPY5R (602001) están localizados conjuntamente en el cromosoma 4q31-q32. Los dos genes se transcriben en direcciones opuestas a partir de una región promotora común. Uno de los exones 5' alternativamente ligados al gen del receptor Y1 es una parte de la secuencia de codificación del receptor Y5. Esta infrecuente reordenación sugirió a Herzog et al. (1997) que los 2 genes surgieron por un fenómeno de duplicación del gen y que pueden expresarse coordinadamente. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Lutz et al. (1997)

MADRID

862

mapearon los genes Npy1r y Npy2r en grupos de ligamiento conservado en los cromosomas 8 y 3 de ratón, respectivamente, que corresponden con la región distal del cromosoma humano 4q".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibid.). El siguiente texto referente a NPYR2 se ha extraído de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY) señala una familia de receptores acoplados a la proteína G presente en el cerebro y en neuronas simpáticas. Se han definido al menos 3 subtipos de receptor de neuropéptido Y sobre la base de criteria farmacológicos, distribución en tejido y estructura del gen de codificación, véanse 162641 y 162643. Rose et al. (1995) informaron de la clonación de expresión en células COS de un cDNA para el receptor tipo 2 humano, NPY2R. Las células transfectadas mostraron una alta afinidad por NPY (162640), el péptido YY (PYY, 600781) y un fragmento de NPY que incluía los aminoácidos 13 a 36. La proteína de 381 aminoácidos prevista tiene 7 dominios transmembrana característicos de los receptores acoplados a la proteína G y es sólo un 31% idéntica al receptor Y1 humano (NPY1R, 162641). Se detectó un mRNA de 4 kb por transferencia Northern de muestras de tejido de diversas regiones del sistema nervioso. Gerald et al. (1995) clonaron el cDNA correspondiente al receptor Y2 de una biblioteca de expresión de cDNA de hipocampo humano utilizando un ensayo de unión de PYY marcado con radioisótopos. Expresaron el gen Y2 en células COS-7 y realizaron un ensayo de unión a hormona que mostró que el receptor Y2 se une (de mayor a menor afinidad) a las hormonas PYY, NPY y polipéptido pàncreático (PP, 167780). Ammar et al. (1996) clonaron y caracterizaron el gen humano que codifica el receptor NPY de tipo 2. La copia abarca 9 kb de secuencia genómica y está codificada en 2 exones. Como en el gen de receptor NPY de tipo 1, la región no traducida de 5' de NPY2R está interrumpida por una secuencia intermedia de 4,5 kb. Ammar et al. (1996) demostraron por análisis Southern de híbridos celulares roedor-humano seguido de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) que el gen NPY2R se mapea en 4q31, la misma región que contiene el gen NPY1R, sugiriendo que estos subtipos pueden haber surgido de la duplicación del gen a pesar de sus diferencias estructurales. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Lutz et al. (1997)

mapearon los genes Npy1r y Npy2r en grupos de ligamiento conservado en los cromosomas 8 y 3 de ratón, respectivamente, que corresponden a la región distal del cromosoma humano 4q".

Se presenta un ensayo para determinar si un agente putativo o real según la presente invención puede unirse a NPY en el documento WO-A-98/52890 (véase la página 96 de éste, líneas 2 a 28).

I:NPY

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:NPY (a veces denominado antagonista de NPY).

Los aspectos amplios de este aspecto de la presente invención se refieren por lo tanto a:

a) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

b) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), siendo el citado agente un I:NPY.

c) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el citado procedimiento el suministro a la hembra de un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

d) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

e) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente un I:NPY.

[illegible] REDO
[illegible] MAN
[illegible] 13
[illegible] RID

866

f) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferìblemente FSAD) o para prevenir FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un I:NPY.

Otros aspectos de la presente invención comprenden:

A) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

B) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, y siendo el citado agente un I:NPY.

C) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

D) Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, y siendo el citado agente un I:NPY.

E) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

F) El uso de un agente en la fabricación de un

MORENO
MADRID

medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra y siendo el citado agente un I:NPY.

G) Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de la hembra de modo que produzca un flujo sanguíneo genital aumentado (por ejemplo vaginal o clitorídeo), y siendo el citado agente un I:NPY.

Se discuten I:NPY (en particular antagonistas de NPY) en los siguientes artículos de revisión:

Dunlop J., Rosenzweig-Lipson, S.: Therapeutic approaches to obesity, Exp. Opin. Ther. Pat. 1999, 8, 12, 1683-1694.

Wang S., Ferguson K.C., Burris T.P., Dhurandhar N.V.: 8th annual international conference on obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus: novel drug developments. Exp. Opin. Invest. Drugs 1999, 8, 7, 117-1125.

Ling A.L.: Neuropeptide Y receptor antagonists. Exp. Opin.

Ther. Pat. 1999, 9, 4, 375-384. Adham N., Tamm J., Du P., Hou C., et al: Identification of residues involved in the binding of the antagonist SNAP 6608 to the Y5 receptor. Soc. Neurosci.Abstr. 1998, 24, parte 2, 626.9.

Shu Y.Z., Cutrone J.Q., Klohr S.E., Huang S.: BMS-192548, a tetracyclic binding inhibitor of neuropeptide Y receptors, from Aspergillus niger. WB2346. II. Physico-chemical properties and structural characterization. J. Antibiot. 1995, 48, 10, 1060-1065.

Rigollier P. Rueger H., Whitebread S., Yamaguchi Y., Chiesi M., Schilling W., Criscione L.: Synthesis and SAR of CGP 71683A, a potent and selective antagonist of the neuropeptide Y Y5 receptor. Int. Symp. Med. Chem., 1998, 15th Edinburgo, 239.

Criscione L., Rigollier P., Batzl-Hartmann C., Rueger H., Stricker-Krongrad A., et al: Food Intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. J. Clin. Invest. 1998, 102, 12, 2136-2145.

Neurogen Corp: NGD 95-1. Clin. Trials Monitor. 1996, 5, 10, Ab 19244.

[illegible] MOLERO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] DRID
Telf. [illegible]

Buttle L.A.: Anti-obesity drugs: on target for huge market sales. Exp. Opin. Invest. Drugs 1996, 5, 12, 1583-1587.

Gehlert D.R., Hipskind, P.A.: Neuropeptide Y receptor antagonists in obesity. Exp. Opin. Invest. Drugs, 1996, 7, 9, 1827-1838.

Goldstein D.J., Trautmann M.E.: Treatments for obesity. Emerging Drugs, 1997, 2-1-27.

Hipskind P.A., Lobb K.L., Nixon J.A., Britton T.C., Bruns R.F., Catlow J., Dieckman McGinty D.K., Gackenheimer S.L., Gitter B.D., Iyengar S., Schober D.A. et al: Potent and selective 1,2,3-trisubstituted indole NPY Y-1 antagonists. J. Med. Chem. 1997, 40, 3712-3714.

Zimmerman D.M., Cantrall B.E., Smith E.C.R., Nixon J.A., Bruns R.F., Gitter B., Hipskind P.A., Ornstein P.L., Zarrinmayeh H., Britton T.C., Schober D.A., Gehlert D.R.: Structure-activity relationships of a series of 1-substituted-4-methilbenzimidazole neuropeptide Y-1 receptor antagonists. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1998, 8, 5, 473-476.

Zarrinmayeh H., Nunes A., Ornstein P., Zimmerman D., Arnold

MORENO
AN
13
MADRID

M.B., et al.: Synthesis and evaluation of a series of novel 2-[(4-chlorophenoxy)methyl]benzimidazoles as selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. J. Med. Chem. 1998, 41, 15, 2709-2719.

Britton T.C., Spinazze P.G., Hipskind P.A., Zimmerman D.M., Zarrinmayeh, H., Schober D.A., Gehlert D.R., Bruns R.F.: Structure-activity relationships of a series of benzotiophene-derived NPY-Y1 antagonists: optimization of the C2 side chain. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1999, 3, 475-480.

Zarrinmayeh H., Zimmerman D.M., Cantrell B.E., Schober D.A., Bruns R.F., Gakenheimer S.L., Ornstein P.L., Hipskind P.A., Britton T.C., Gehlert D.R.: Structure-activity relationship of a series of diaminoalkyl substituted benzimidazole as neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. Bioorganic, Med. Chem. Lett. 1999, 5, 647-652.

Murakami Y., Hara H., Okada T., Hashizume S., Kii, M., Ishihara, Y., Ishikawa, M., Mihara, S-I., Kato, G., Hanasaki, K., Hagishita, S., Fujimoto M.: 1,3-disubstituted benzazepines as novel, potent, selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. J. Med. Chem. 1999, 42, 14, 2621-2632.

MADRID

Rudolf K., Eberlein W., Engel W., Wieland H.A., Willim K.D., Entzeroth M., Wienen W., Beck Sickinger A.G., Doods, H.N.: The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur. J. Pharmacol. 1994, 271, 2-3, R11-R13.

Wieland H.A., Willim K.D:, Entzeroth M., Wienen W., Rudolf K., Eberlein W. Engel W., Doods H.N.: Subtype selectivity and antagonist profile of the nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1995, 275, 1, 143-149.

Wright J., Bolton G., Creswell M., Downing D., Georgic L., Heffner T., Hodges J., MacKenzie R., Wise L.: 8-amino-6-(arylsulphonyl)-5-nitroquinolones: novel nonpeptide neuropetide Y1 receptor antagonists. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1996, 6, 15, 1809-1814.

Capurro D., Huidobro-Toro J.P.: The involvements of neuropeptide Y Y1 receptors in the blood pressure baroreflex: studies with BIBP 3226 and BIB 3304. Eur. J. Pharmacol. 1999, 376, 3, 251-255.

Dumont Y., Cadieux A., Doods H., Quirion R.: New tools to investigate neuropeptide Y receptors in the central and

MORENO
MAN
MADRID
Telé.

peripheral nervous systems: BIBO-3304 (Y1), BIIE-246 (Y2) y [125I]-GR-231118 (Y1/Y4). Soc. Neurosci. Abstr. 1999, 25, parte 1, Aptdo. 74.11.

Hedge S.S., Bonhaus D.W., Stanley W., Eglen R.M., Moy T.M., Loeb M., et al.: Pharmacological evaluation of 1229U91, a high affinity and selective neuropeptide Y(NPY)-Y1 receptor antagonist. Pharmacol. Res. 1995, 31, 190.

Matthews J.E., Chance W.T., Grizzle M.K., Heyer D., Daniels A.J.: Food intake inhibition and body weight loss in rats treated with GI 264879A, an NPY-Y1 receptor. Soc. Neurosci. Abstr. 1997, 23, parte 2, 1346.

Doods H.N., Willim K-D., Smith S.J.: BIBP 3226: a selective and highly potent NPY-Y1 antagonist. Proc. Br. Pharmacol. Soc. 1994, 13-16, Dec. C47.

Rudolf K., Eberlein, W., Engel W., Wieland H.A., Willim K.D., Entzeroth M., Wienen W., Beck Sickinger A.G., Doods H.N.: The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur. J. Pharmacol. 1994, 271, 2-3, R11-R13.

Serradelil-Le-Gal C., Valette G., Rouby P.E., Pellet A.,

PAT[illegible] MORENO
[illegible]AN
113
[illegible]RID

874

Villanova G., Foulon L., Lespy L., Neliat G., Chambon J.P., Maffrand J.P., Le-Fur G.: SR 120107A y SR 120819A: Two potent and selective, orally-effective antagonists for NPY Y1 receptors. Soc. Neurosci. Abstr. 1994, 20, parte 1, 907, Aptdo. 376.14.

Hong Y., Gregor V., Ling A.L., Tompkins E.V., Porter J. Chou T.S., Paderes G., Peng Z., Hagaman C., Anderes K., Luthin D., May J.: Synthesis and biological evaluation of novel guanylurea compounds as potent NPY Y1 receptor antagonist. Acs 1999, 217, Anaheim MEDI 108.

Se describen I:NPY (en particular antagonistas de NPY) en los siguientes documentos:

WO-98/07420
WO-94/00486
WO-96/22305
WO-97/20821
WO-97/20822
WO-96/14307
JP-07267988
WO-96/12489
US-5552422
WO-98/35957

[illegible] MADRID

875

WO-96/14307

WO-94/17035

EP-0614911

WO-98/40356

EP-0448765

EP-0747356

WO-98/35941

WO-97/46250

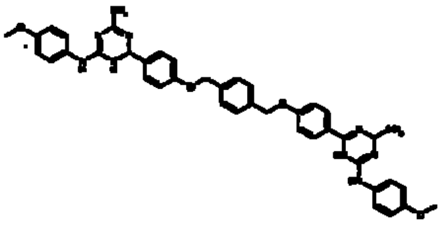
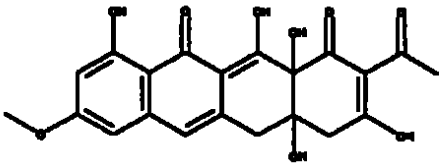
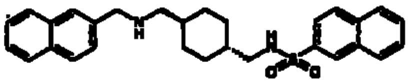
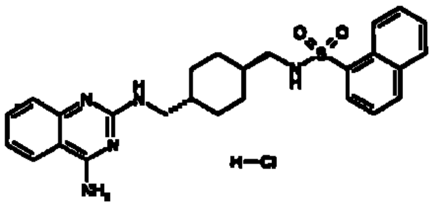
EP-0747357

Los ejemplos preferidos de I:NPY se seleccionan de las siguientes estructuras. Estos compuestos se ensayaron como agentes según la presente invención y se encontraron útiles para potenciar el cAMP, siendo por ello útiles en el tratamiento de FSAD. Algunos de los datos experimentales referentes a estos compuestos se presentan en la sección experimental (a continuación).

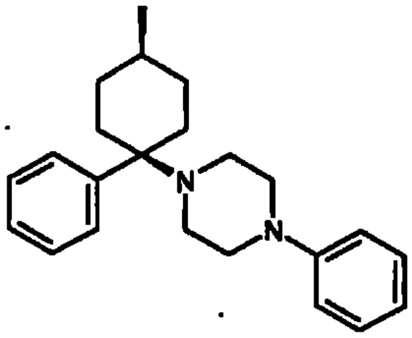
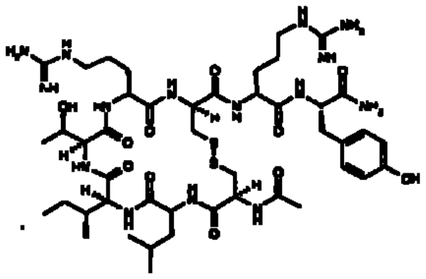
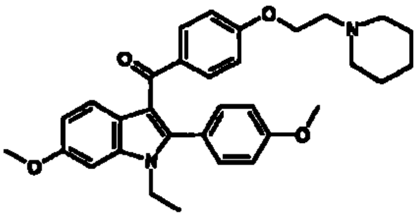
| Compuesto | Estructura | Modo de acción<br>Referencias |
|---|---|---|

... GENO
... AN
... MADRID

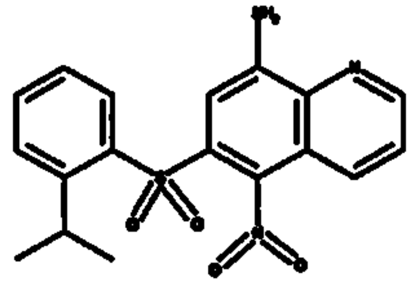
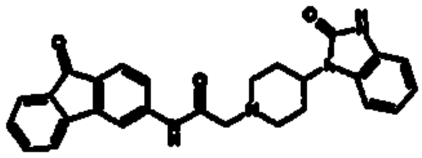
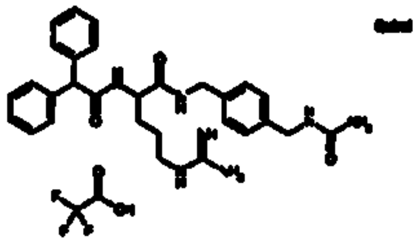
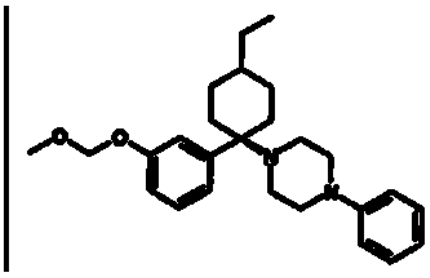
876

| | | |
|---|---|---|
| F34 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/07420<br>Ref. 3 |
| F35 |  | I:NPY<br>Ref. 5 |
| F36 |  | I:NPY Y5<br>Ref 1,4 |
| F37 | dímero (2,2'),(4,4')-disulfuro cíclico Ile-Cys-Pro-Cys-Tyr-Arg-Leu-Arg-Tyr-NH2 | I:NPY Y1<br>WO-94/00486<br>WO-96/22305<br>Ref. 1, 2, 23 |
| F38 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/20821<br>WO-97/20822<br>Ref. 1, 3, 6, 7 |

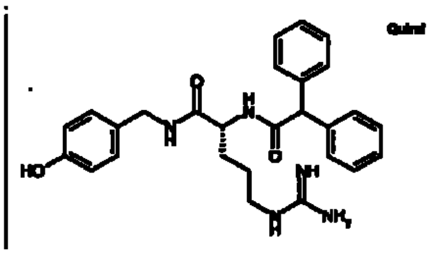
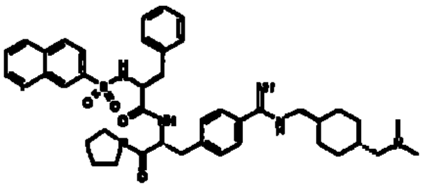
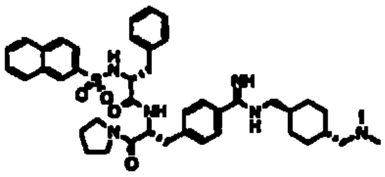
PATIEN [illegible] ROMERO
INGL [illegible] AN
C. [illegible] 113
Teléf. 51 [illegible] MADRID

| | | |
|---|---|---|
| F39 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref. 1, 8, 9, 10, 11 |
| F40 |  | I:NPY Y1<br>JP-07267988<br>Ref. 1 |
| F41 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/12489<br>Ref. 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |

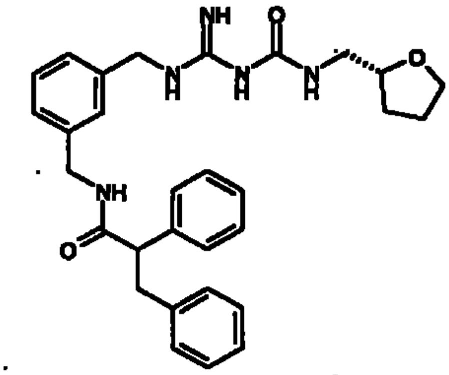
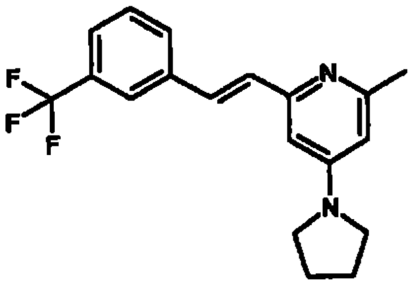
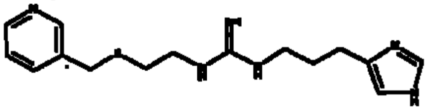
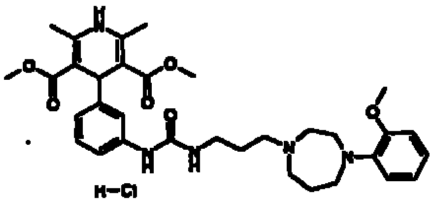
898

| | | |
|---|---|---|
| F42 |  | I:NPY Y1<br>US-5552422<br>Ref 17, 18, 19, 20 |
| F43 |  | I·NPY Y5<br>WO-98/35957<br>Ref 3 |
| F44 |  | I:NPY Y1<br>Ref. 21, 22 |
| F45 |  | I.NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref 3 |

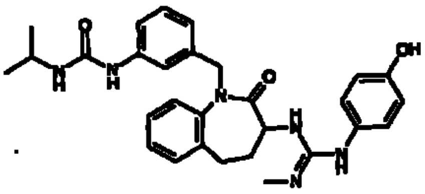
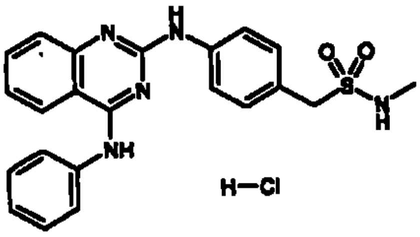
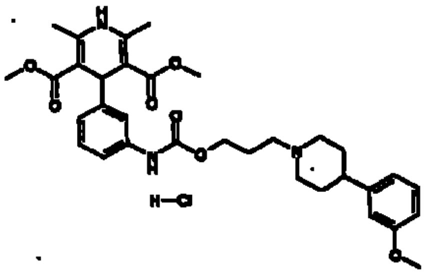
PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

| | | |
|---|---|---|
| F46 | Para la fórmula véase la referencia | I:NPY Y1<br>Ref. 24 |
| F47a |  | I:NPY Y1<br>WO-94/17035<br>Ref. 3, 17, 15, 26 |
| F47b | Para la fórmula véase la referencia | I:NPY Y1<br>Ref. 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |
| F48 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref. 27 |
| F49 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27. |

PATENTES
INC
c
Telef.
RID

| | | |
|---|---|---|
| F50 |  | I:NPY Y1<br>Ref. 28 |
| F51 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/40356 |
| F52 |  | I:NPY<br>EP-0448765 |
| F53 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747356 |

PATRICIA
ING
C
Teléf
RID

| | | |
|---|---|---|
| F54 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/35941 |
| F55 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/46250 |
| F56 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747357 |

VIP (péptido intestinal vasoactivo)

Según un aspecto de la presente invención, una diana de $P_{cAMP}$ es VIP o uno de sus receptores asociados. La clasificación/nomenclatura actual se refiere a estos como VPAC1, VPAC2 y PACAP.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL. S Y [illegible]
C. [illegible] nº, 113 [illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos para VIP y sus receptores están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

Hemos mostrado que VPAC1 y VPAC2 están presentes en la vagina humana y en la de conejo. PACAP estaba ausente tanto en la vagina de conejo como humana.

VIP es un importante neurotransmisor endógeno liberado durante la excitación sexual que es responsable de la vasodilatación vaginal inducida por el nervio del lecho vascular localizado en la pared vaginal. Estos efectos vasodilatadores están mediados por la activación de adenilato ciclasa y la producción de cAMP. Sin pretender limitarse a la teoría, este efecto puede estar mediado a través de receptores de VIP subtipos $VPAC_1$, $VPAC_2$ o PACAP (péptido activador de la adenilato ciclasa en la pituitaria). Los receptores $VPAC_2$ y PACAP son los más ampliamente extendidos en el SNC y estos receptores, a pesar de expresarse en la pituitaria, parecen no tener una función biológica extendida.

El agente de la presente invención podría potenciar el VIP y/o actuar como un mimético o análogo de éste. El agente

PAT. ... MORENO
INGL. ... LAN
c. ... 113
Teléf. 519... - MADRID

potenciaría entonces y/o imitaría los efectos vasorrelajantes del VIP endógeno liberado durante la excitación sexual. El agente puede tener también un efecto aditivo sobre la relajación del músculo liso vaginal inducida por VIP. Clínicamente, esto conducirá al tratamiento de los FSAD mediante el aumento de la lubricación vaginal a través de la congestión y flexibilidad de la pared vaginal.

Un agente adecuado piede ser un análogo de VIP.

Las explicaciones de los antecedentes sobre VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente al VIP se ha extraído de esa fuente.

> "El péptido intestinal vasoactivo (VIP), un péptido de 28 aminoácios aislado originalmente de duodeno porcino, está presente no sólo en tejidos gastrointestinales sino también en tejidos neuronales, posiblemente como neurotransmisor, y exhibe una amplia variedad de acciones biológicas. Debido a que el VIP muestra similitudes con el

PAT. [illegible] MORENO
INGL. [illegible]
c. [illegible] 113
Telef. [illegible] - MADRID

glucagón, la secretina y el péptido inhibitorio gástrico (GIP), se ha considerado un miembro de la familia de glucagón-secretina. El producto primario de traducción del mRNA que codifica el VIP (prepro-VIP) tiene un peso molecular de 20 dalton. Por clonación de la secuencia de DNA complementaria al mRNA que codifica el VIP humano, Itoh et al. (1983) encontraron que el precursor de VIP contiene no sólo el VIP sino también un nuevo péptido de 27 aminoácidos, designado como PHM27, que tiene histidina aminoterminal y metionina carboxiterminal. Difiere del PHI17 aislado de intestino porcino en 2 aminoácidos, el PHI27, como su designación indica, tiene isoleucina carboxiterminal. Linder et al. (1987) aislaron el gen humano de VIP y PHM27 y estudiaron su expresión en diversos tejidos de rata. Heinz-Erian et al. (1985) sugirieron que la deficiente innovación de las glandulas sudoríparas de los pacientes con fibrosis quística por el neuropéptido VIP podría ser un mecanismo básico de reducción del contenido de agua y de impermeabilidad relativa del epitelio al cloruro y a otros iones que caracteriza a la fibrosis quística. Para comprobar esta hipótesis, Gozes et al. (1987) adoptaron el enfoque de "gen candidato". Bodner et al. (1985)

glucagón, la secretina y el péptido inhibitorio gástrico (GIP), se ha considerado un miembro de la familia de glucagón-secretina. El producto primario de traducción del mRNA que codifica el VIP (prepro-VIP) tiene un peso molecular de 20 dalton. Por clonación de la secuencia de DNA complementaria al mRNA que codifica el VIP humano, Itoh et al. (1983) encontraron que el precursor de VIP contiene no sólo el VIP sino también un nuevo péptido de 27 aminoácidos, designado como PHM27, que tiene histidina aminoterminal y metionina carboxiterminal. Difiere del PHI17 aislado de intestino porcino en 2 aminoácidos, el PHI27, como su designación indica, tiene isoleucina carboxiterminal. Linder et al. (1987) aislaron el gen humano de VIP y PHM27 y estudiaron su expresión en diversos tejidos de rata. Heinz-Erian et al. (1985) sugirieron que la deficiente innovación de las glandulas sudoríparas de los pacientes con fibrosis quística por el neuropéptido VIP podría ser un mecanismo básico de reducción del contenido de agua y de impermeabilidad relativa del epitelio al cloruro y a otros iones que caracteriza a la fibrosis quística. Para comprobar esta hipótesis, Gozes et al. (1987) adoptaron el enfoque de "gen candidato". Bodner et al. (1985)

PATRICIA [illegible] MORENO
ING [illegible] AN
[illegible] 13
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

habían mostrado que el VIP y el PHM-27 están codificados por exones adyacentes. Gozes et al. (1985) utilizaron el fragmento genómico de codificación de PHM-27 para detectar la presencia del gen VIP en 6q21-qter. De esta manera, eliminaron un gen defectivo de VIP como candidato a causa primaria de fibrosis quística (que está codificada en el cromosoma 7). Por técnicas de hibridación in situ, Gozes et al. (1987) asignaron el gen VIP a 6q24. Esto colocó a VIP en la región de MYB (189990), que se ha mapeado en 6q22. Gozes et al. (1987) investigaron una relación funcional entre los 2 genes en tejido neuronal. Observaron un pico agudo de mRNA de MYB en el hipocampo de ratas de 3 días de edad, antes del pico de mRNA de VIP que aparece en este área a los 8 días de edad. Omary y Kagnoff (1987) encontraron receptores nucleares para el VIP en una línea celular de adenocarcinoma colónico humano. Gotoh et al. (1988) asignaron el VIP al cromosoma 6 por hibridación de transferencia de manchas de un fragmento clonado molecularmente del gen a cromosomas clasificados. La localización se refinó a 6q26-q27 por hibridación in situ".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes

[illegible] MORENO
[illegible] L [illegible]AN
[illegible] 113
[illegible]DRID
Tel. [illegible]

sobre el VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a VIPR1 o VPAC1 se ha extraido de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP, 192320) es un mediador neuroendocrino octacosamérico encontrado principalmente en neuronas presinápticas colinérgicas del sistema nervioso central y en neuronas peptidérgicas periféricas que inervan diversos tejidos. De los muchos pétidos neuroendocrinos con funciones inmunológicas, el VIP se distingue por su capacidad de afectar tanto a células B como a células T directamente. Los distintos subconjuntos de células neuronales, respiratorias, gastrointestinales e inmunes llevan receptores de alta afinidad específicos de VIP, que están asociados con una proteína de unión al nucleótido guanina (G) capaz de activar la adenilato ciclasa. Libert et al., (1991) obtuvieron 4 nuevos receptores de la familia de receptores acoplados a la proteína G por amplificación selectiva y clonación de cDNA tiroide. Uno de ellos, RDC1, fue identificado como el receptor de VIP por Sreedharan et al (1991). Libert et al. (1991) mapearon el gen VIPR en 2q37 por hibridación in situ. Informaciones posteriores hicieron dudoso que el gen mapeado en 2q37 fuera de hecho el gen del receptor de VIP (Vassart, 1992). La secuencia que designó como GPRN1 Sreedharan et al. (1991) y que se mapeó en 2q37 se encontró que no se unía a VIP según Wenger (1993). Sreedharan et al. (1995) aislaron un gen del receptor de VIP de tipo I auténtico y lo localizaron por fluorescencia de hibridación in situ en la banda de 3p22 en una región asociada al cáncer de pulmón de células pequeñas. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Hashimoto et al. (1999) mapearon el gen Vipr1 de ratón en la región distal del cromosoma 9, una región que muestra homología de sintenia con el cromosoma humano 3p. Sreedharan et al. (1993) clonaron un gen del receptor de VIP intestinal humano, la secuencia de aminoácidos deducida comparte el 84% de identidad con el receptor de VIP de pulmón de rata. Couvineau et al. (1994) aislaron 2 clones de cDNA de VIPR a partir de una biblioteca de cDNA de célula epitelial de yeyuno humano. Uno codifica un receptor de VIP que consiste en 460 aminoácidos y que tiene 7 dominios transmembrana putativos, así como otros receptores acoplados a la proteína G. El otro codifica una proteína relacionada con el receptor de VIP de 495 aminoácidos que exhibe un 100% de homología con el

MORENO
113
ADRID

receptor de VIP funcional a lo largo de 428 aminoácidos y en la región C-terminal, pero que contiene un dominio N-terminal completamente divergente de 67 aminoácidos. Cuando se expresa en células COS-7, la segunda proteína no une VIP radioyodado, aunque se dirigió normalmente a la membrana plasmática como se evaluó por estudios de inmunofluorescencia. Sreedharan et al. (1995) encontraron que el receptor de VIP de tipo I, también denominado receptor PACAP de tipo II (véase 102981 para otro tipo de receptor PACAP) abarcaba aproximadamente 22 kb y comprendía 13 exones (entre 42 y 1.400 pb) y 12 intrones (entre 0,3 y 6,1 kb). Sreedharan et al. (1995) caracterizaron también le promotor y la región adyacentedel extremo 5' del gen".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre el VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a VIPR2 o VPAC2 se ha extraido de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP, 192320) y el polipéptido activante de la adenilato ciclasa en pituitaria (PACAP, 102980) son péptidos homólogos que

PAT[illegible] MORENO
ING [illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

funcionan como neurotransmisores y como hormonas neuroendocrinas. Aunque los receptores de VIP y PACAP comparten homología, difieren en sus especificidades de sustrato y en sus patrones de expresión. Veáse VPR1 (192321) y ADCYAP1R1 (102981). Svoboda et al. (1994) realizaron una PCR de bajo rigor utilizando cebadores basados en secuencias conservadas entre los receptores de VIP. Clonaron el gen del receptor de VIP2 humano de una biblioteca de cDNA de linfoblasto. Este gen codificaba un polipéptido de 438 aminoácidos que comparte el 86% de identidad con el receptor de VIP2 de rata. Expresaron el receptor de VIP2 humano en células de ovario de hámster chino y encontraron que se une a PACAP-38, PACAP-27, VIP y helodermina, y esa unión del receptor a cualquiera de estos péptidos activa la adenilato ciclasa. Se encontró que la unión de los péptidos estaba inhibida por GTP. Adamou et al. (1995) clonaron el gen del receptor de VIP2 de una biblioteca de cDNA de placenta humana. La transferencia Northern reveló que VIPR2 se expresaba como 2 transcriptos de 4,6 kb y 2,3 kb a altos niveles en el músculo esquelético y a niveles menores en corazón, cerebro, placenta y páncreas. Mackay et al. (1996) utilizaron hibridación in situ con fluorescencia para mapear el gen VIPR2. Posteriores

891

mapeados con líneas celulares derivadas de pacientes con holoprosencefalia tipo 3 (HPE 3, 142945) revelaron que el gen VIPR2 se encuentra en la región crítica mínima HPE3. MacKay et al (1996) afirmaron que aunque VIPR2 puede contribuir al fenotipo de HPE3, no es el único factor responsable".

AC (adenilato ciclasa)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es la AC.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de AC están disponibles en la bibliografía.

Para confirmar que el VIP induce la vasorrelajación a través de la elevación de los niveles de cAMP intracelular y la consiguiente activación de la adenilato ciclasa, se han medido las concentraciones de cAMP vaginal durante la estimulación con VIP y se ha utilizado forscolina, un activador de adenilato ciclasa, para imitar los efectos de activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa.

En estos estudios, se encuentra que el tratamiento con VIP y forscolina eleva las concentraciones intracelulares de

MORENO
MADRID
Telf.

cAMP en tejido vaginal aislado.

También se encuentra que la forscolina aumenta el flujo sanguíneo vaginal en un modelo animal de excitación sexual.

Además encontramos que la forscolina induce la relajación en la vagina aislada.

Las explicaciones de los antecedentes sobre la AC y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a la AC se ha extraído de esa fuente.

> "La adenilato ciclasa (EC 4.6.1.1) cataliza la transformación de ATP en AMP cíclico. La actividad enzimática está bajo el control de varias hormonas, y diferentes polipéptidos participan en la transducción de la señal del receptor al resto catalítico. Los receptores estimuladores o inhibidores (Rs y Ri) interactúan con las proteínas G (Gs y Gi) que exhiben actividad GTPasa y modulan la actividad de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. Parma et al. (1991) clonaron un cDNA

PATRICIA ... MORENO
ING... MAN
... 113
... MADRID
Tel...

correspondiente a adenililciclasa de cerebro humana, simbolizada por ellos como HBAC1. Por hibridación in situ a extensiones cromosómicas en metafase utilizando la sonda de cDNA de cerebro humano, Stengel et al. (1992) mostraron que el gen está localizado en 8q24.2. Se asignó un gen altamente homólogo, ADCY2 (103071) a 5p15.3 mediante el mismo procedimiento".

## TECNICAS DE METODOLOGIA GENERAL DE DNA RECOMBINANTE

Aunque en general las técnicas mencionadas en la presente son bien conocidas en la técnica, puede hacerse referencia en particular a Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) y a Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999), 4ª edición, John Wiley & Sons, Inc. Se describe la PCR en los documentos US-A-4683195, US-A-4800195 y US-A-4965188.

## SUMARIO

En resumen, la presente invención se refiere a:

1. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD,

comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD.

3. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSD, en particular FSAD, comprendiendo el

PATRICIA ... MORENO
ING...
MADRID
Telf.

procedimiento de ensayo: poner en contacto a un agente con cAMP y medir la actividad de cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a:

5. Una composición farmacéutica para uso consiguiente en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP
$I:PDE_{cAMP}$
$I:PDEn_{cAMP}$
I:NPY
$I:NPY\ Y_n$
I:NEP
$U:A_{cAMP}$
A:AC

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL[illegible]S Y [illegible]
[illegible] 113 [illegible]ADRID
Telf. [illegible]

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

$P_{cAMP}$.

6. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, siendo el agente capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP

I:$PDE_{cAMP}$

I:$PDEn_{cAMP}$

I:NPY

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

$P_{cAMP}$.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MAN
INO [illegible]
[illegible] RID

7. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

8. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede tratar a una hembra que sufre FSD, en particular

PATRICIA KOCH MORENO
ING...

FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo la determinación de si un agente putativo es capaz o no de actuar como uno o más de:

un mimético de cAMP
I:$\text{PDE}_{\text{cAMP}}$
I:$\text{PDEn}_{\text{cAMP}}$
I:NPY
I:NPY $\text{Y}_{\text{n}}$
I:NEP
U:$\text{A}_{\text{cAMP}}$
A:AC
A:VIPr
A:$\text{VIP}_{\text{n}}$
I:I:VIPr
I:I:$\text{VIP}_{\text{n}}$
$\text{P}_{\text{cAMP}}$.

en el que si el agente putativo es capaz de actuar como uno o más de

un mimético de cAMP
I:$\text{PDE}_{\text{cAMP}}$
I:$\text{PDEn}_{\text{cAMP}}$
I:NPY

[illegible] MORENO [illegible] AN [illegible] RID

$I{:}NPY\ Y_n$

I:NEP

$U{:}A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

$A{:}VIP_n$

I:I:VIPr

$I{:}I{:}VIP_n$

$P_{cAMP}$.

entonces el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a:

9. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo vaginal, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimlar la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. El uso de un agente en la fabricación de un

PATRICIA [illegible] MORENO

medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal, siendo el agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra.

11. Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra de modo que produzca un aumento del flujo sanguíneo vaginal.

## EJEMPLOS

La presente invención se describirá a continuación, sólo como ejemplos, en los que se hace referencia a las siguientes Figuras:

La Figura 1 que es un gráfico,
La Figura 2 que es un gráfico,
La Figura 3 que es un gráfico,
La Figura 4 que es un gráfico,
La Figura 5 que es un gráfico,
La Figura 6 que es un gráfico,
La Figura 7 que es un gráfico,
La Figura 8 que es un gráfico,

La Figura 9 que es un gráfico, y

La Figura 10 que es un gráfico.

Más detalladamente:

Figura 1. Estimulación eléctrica del nervio pélvico que induce un aumento dependiente de la frecuencia del flujo sanguíneo vaginal en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Al aumentar la frecuencia de estimulación se inducen mayores aumentos del flujo sanguíneo. Se monitorizaron los cambios utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 2. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. La Figura 2A ilustra cómo aumenta el flujo sanguíneo vaginal de manera dependiente de la concentración por infusiones de VIP (bolo intravenoso). La Figura 2b demuestra que 2 infusiones repetidas de VIP producen aumentos similares del flujo sanguíneo. Obsérvese que la duración de la respuesta es también similar. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 3. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) reduce la

presión sanguínea arterial media en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Este gráfico ilustra los efectos típicos de los agentes vasoactivos, y los parámetros de estimulación utilizados para investigar el flujo sanguíneo en la vagina, respecto a la presión arterial media en un conejo anestesiado. Estos efectos observados son típicos de las tendencias vistas en todos los animales ensayados. El VIP indujo una depresión significativa de la presión arterial media mientras la estimulación del nervio pélvico, no teniendo efecto las infusiones de control de hepsalina o de inhibidores de $PDE_{cAMP}$ o NEP sobre la presión sanguínea. Obsérvese que la reducción de la presión sanguínea asociada con las infusiones de VIP está también asociada a un gran aumento del ritmo cardiaco.

Figura 4. La activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa imita la vasorrelajación mediada por VIP y la relajación de músculo liso en tejido vaginal. La Figura 4a ilustra que una infusión de forscolina (un mimético de cAMP, 40 nmol/kg/bolo intravenoso) induce aumentos significativos del flujo sanguíneo vaginal. Obsérvese que la amplitud y duración de la respuesta es similar a la inducida por el VIP (20,0 µg/kg bolo intravenoso). Resulta interesante que los efectos sobre el flujo sanguíneo tienen

PATRICIA ... MORENO
MADRID

una duración mayor de acción sobre la pared vaginal externa. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler. La Figura 4b demuestra que tanto el VIP (0,1 μM) como la forscolina (10 μM) elevan significativamente las concentraciones intracelulares de cAMP por encima de los niveles basales en vagina de conejo. La Figura 4c muestra que la forscolina induce potentes relajaciones en bandas vaginales de conejo precontraídas (1 μM de fenilefrina) con un CI de aproximadamente 300 nM. Se cuantificaron todos los cambios utilizando tecnologías de láser Doppler in vivo, enzimoinmunoensayo de cAMP bioquímico o de relajación de tejidos in vitro.

Figura 5. Un inhibidor selectivo de NEP EC 3.4.24.11 estimula el aumento del flujo sanguíneo vaginal por estimulación del nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. PNS repetidas con intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (barra blanca). La administración de un inhibidor de NEP (barra gris), estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4Hz), comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control o controles de vehículo coincidentes en el tiempo (barra rayada). Se observaron los

siguientes aumentos dependientes de la dosis: 0,3 mg/kg, iv, indujo un aumento del 40%, y 1,0 mg/kg, iv, indujo un aumento del 91% (media, n = 3). El inhibidor de NEP no tuvo efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (no estimulado) (datos no mostrados). Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler

Figura 6. Los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 estimulan los aumentos de flujo sanguíneo vaginal inducidos por VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las infusiones de VIP repetidas en intervalos de 30 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b). El inhibidor de NEP potencia la amplitud y prolonga la duración del flujo sanguíneo estimulado cuando estos aumentos estan inducidos por dosis submáximas de VIP, por ejemplo 0,3 µg/kg. A dosis de VIP que inducen aumentos máximos del flujo sanguíneo vaginal, por ejemplo 3 µg/kg, los inhibidores de NEP potencian sólo la duración del flujo sanguíneo vaginal. Se muestran los aumentos inducidos por VIP en presencia de un inhibidor de NEP como triángulos negros, mostrándose las respuestas de control VIP como triángulos blancos. La infusión de control de hepsalina no tiene efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando técnologías de láser Doppler.

PATRICIA [illegible] MORENO
ING. [illegible]
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

Figura 7. Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal estimulados por el nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las PNS repetidas en intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (cuadrados blancos). La administración del inhibidor de $PDE_{cAMP}$ tipo 2 estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (cuadrados negros, a 4Hz) comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control coincidente en el tiempo (cuadrados blancos). Una infusión del inhibidor PDE2 (500 μg/kg) indujo una estimulación de 86,8 ± 21,9% del flujo sanguíneo vaginal (media ± s.e.m. error típico de la media), n= 2). Todos los cambios se monitorizaron utilizando técnologías de láser Doppler.

Figura 8: Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal inducidos por el VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las infusiones de VIP repetidas en intervalos de 30 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b). Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 (25 μg/kg, bolo intravenoso) potencia la duración del flujo sanguíneo vaginal estimulado

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Telé.

inducido por VIP (3 µg/kg, bolo intravenoso). Los aumentos inducidos por el VIP en presencia de un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ se muestran como triángulos negros, mientras que las respuestas control de VIP se muestran como triángulos blancos. La infusión control de hepsalina no tuvo efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 9. Un antagonista selectivo de los receptores de NPY Y1 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal estimulados por el nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las PNS repetidas en intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (datos no mostrados). La administración de un antagonista de NPY Y1 (barra gris) estimula el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4Hz), comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control o los controles de vehículo coincidentes en el tiempo (barra rayada). Se observaron los siguientes aumentos dependientes de la dosis: 0,01 mg/kg, iv, indujo un aumento del 15,8 ± 19,6%, 0,03 mg/kg, iv, indujo un aumento del 35,1 ± 17,17%, 0,10 mg/kg indujo un aumento del 60,1 ± 16,9% y 0,3 mg/kg indujo un aumento del 91,1 ± 27,4% (media ± s.e.m. n = 3). El antagonista de NPY

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] ADRID

Y1 no tuvo efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (no estimulado) (datos no mostrados). Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

La Figura 10 proporciona un gráfico resumen para algunos de los datos proporcionados en la presente, que muestra que los agentes de la presente invención son muy útiles para aumentar el flujo sanguíneo vaginal por potenciación de los niveles de cAMP endógeno.

## UN ENSAYO PARA MEDIR LAS ACTIVIDADES/NIVELES DE cAMP

Medida de cAMP en muestras de tejidos vaginales utilizando un estuche de enzimoinmunoensayo (EIA) para cAMP de Biotrak (Amersham Life Sciences RPN 225).

Los niveles de cAMP se miden por EIA en muestras de tejido vaginal. El EIA se basa en la competición entre cAMP sin marcar y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa para una cantidad limitada de anticuerpo específico de cAMP.

### 1. MATERIALES

Todos los materiales son suministrados por el estuche EIA

PATRICIA INGEN MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
113
MADRID

para cAMP de Amersham Life Sciences (RPN 225), a menos que se indique otra cosa.

1.1 Placa de microvaloración. Placa de 96 pocillos recubierta con IgG de asno anti-conejo.

1.2 Tampón de ensayo. Tampón acetato de sodio 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Los contenidos del frasco se transfieren a una probeta graduada utilizando lavados de agua destilada, 3 x 15 ml. El volumen final se ajusta entonces a 500 ml.

1.3 Patrón de cAMP (para el procedimiento de acetilación). cAMP a 10,24 pmol/ml en tampón acetato 0,05, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Se disuelve el patrón en 2,5 ml de tampón de ensayo para su uso.

1.4 Antisuero. Anticuerpo anti-cAMP en tampón acetato 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Antes de su uso, se diluye el anticuerpo con 11 ml de tampón de ensayo y se mezcla por inversión suave para disolver los contenidos.

1.5 Conjugado de cAMP. cAMP-peroxidasa de rábano picante en tampón acetato 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su

MORENO

reconstitución. Antes de su uso, se diluye la disolución con 11 ml de tampón de ensayo y se mezcla por inversión suave para disolver los contenidos.

1.6 Tampón de lavado. Tampón fosfato 0,01 M, pH 7,5, que contiene Tween™20 al 0,05% (v/v) tras su reconstitución. Se transfieren los contenidos del frasco a una probeta graduada utilizando lavados de agua destilada, 3 x 15 ml. El volumen final se ajusta a 500 ml.

1.7 Sustrato TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)/peróxido de hidrógeno en dimetilformamida al 20% (v/v).

Preparado para su uso.

1.8 Reactivo de acetilación. 2 ml de anhídrido acético, 4 ml de trietilamina, preparado según sea necesario.

1.9 Acido sulfúrico (1M). Se prepara ácido sulfúrico 1 M a partir de una disolución madre 18M (BDH).

Se añaden 1,11 ml a 18,8 ml de agua destilada.

## 2. EQUIPAMIENTO ESPECIFICO

2.1 Tubos de ensayo de vidrio de 5 ml desechables.

2.2 Lector espectrofotométrico de placas (Spectra max 190)

2.3 Agitador de placas de microvaloración (Luckham R100).

[illegible] MORENO
[illegible] RID

## 3. PROCEDIMIENTOS

- Preparación de muestras de tejido. Se trataron los tejidos con el pretratamiento relevante en muestras de 5 ml en disolución salina fisiológica, por ejemplo, agonistas, miméticos de cAMP, etc. Después del tratamiento, las muestras se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y después se trituraron utilizando un martillo. Se rascó el polvo en un tubo de centrífuga y se añadió 1 ml de ácido perclórico (PCA) 0,5 M enfriado con hielo. Se agitó en Vortex la muestra, se mezcló y se dejó en hielo durante 1 hora.

- Extracción de cAMP de muestras de tejido. Se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en otros tubos de centrífuga. Se conservó el sedimento para análisis de proteína a -80°C. Se neutralizaron después las muestras de sobrenadante a pH 6 utilizando $K_3PO_4$. Se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se lavó 4 veces con 5 volúmenes (5 ml) de éter dietílico saturado de agua. Se desechó la capa superior de éter después de cada lavado. Se transfirió la capa acuosa a un tubo corto de vidrio fino y se secó en atmósfera de nitrógeno a 60°C. Se disolvió el extracto seco en 1 ml de tampón de ensayo y se almacenó en nevera hasta

PATRICIA KOCH MORENO
ALEMAN
RID

que fue necesario (o también puede congelarse).

- Se equilibran las disoluciones madre de los reactivos a temperatura ambiente y se preparan las disoluciones de trabajo.

- Se preparan los patrones de cAMP en tubos de vidrio etiquetados como 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 fmol. Esto se consigue añadiendo 1 ml de tampón de ensayo a todos los tubos excepto al de patrón de 512 fmol. Se añade entonces 1 ml de patrón de acetilación (10,24 pmol/ml) a los dos patrones superiores (256 y 512 fmol. Se agita con Vortex el patrón de 256 fmol y se transfiere 1 ml al patrón de 128 fmol. Esto se vuelve a llevar a cabo hasta el patrón de 2 fmol, en el que se dispone 1 ml de disolución. Se establece un tubo patrón cero que contiene 1 ml de tampón de ensayo.

- Se descongelan las muestras de extractos de tejidos en hielo (si es necesario) y se diluyen 1 a 100 (10 µl de muestra en 990 µl de tampón de ensayo) en tubos de vidrio etiquetados.

- Se acetila el cAMP en todos los patrones y muestras por adición de 100 µl de reactivo de acetilación, en campana de gases, que se añaden en un lado del tubo antes de la inmediata agitación en Vortex.

- Se añaden 50 µl de todos los patrones y muestras a los pocillos apropiados de la placa de 96 pocillos, y se añaden

PATRICIA ... MORENO
ING. ... AN
... MADRID
Telf. ...

150 $\mu$l de tampón de ensayo a los pocillos de unión no específica (NSB).

- Se añaden 100 $\mu$l de antisuero a todos los pocillos excepto a los blancos (B) y a los NSB antes de incubar durante 2 horas a 3-5°C
- Después de la incubación, se añaden 100 $\mu$l de conjugado cAMP-peroxidasa a todos los pocillos excepto a los B antes de 1 hora más de incubación a 3-5°C.
- Se vacían las placas dándoles la vuelta y transfiriendo a un papel absorbente antes de lavar cada pocillo cuatro veces con 400 $\mu$l de tampón de lavado. Después de cada lavado se retransfieren las placas para asegurar que se extrae cualquier tampón de lavado residual. Se añaden inmediatamente después 200 $\mu$l de TMB a todos los pocillos.
- Se ponen las placas en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 100 $\mu$l de ácido sulfúrico 1 M en todos los pocillos. Se lee la densidad óptica en un dispositivo Spectra max 190 a 450 nm durante 30 minutos.

## 4. PATRONES

Se establecen con cada ensayo los siguientes tubos patrones:

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] ALEMAN
[illegible] 3
[illegible]DRID

4.1 Adición de un patrón en tampón de ensayo

Se añade una cantidad conocida de cAMP en tampón de ensayo para determinar la eficacia del ensayo. Se añaden 70 pmol/ml de cAMP al tampón de ensayo, que es equivalente a 35 fmol/pocillo en el ensayo, que está en la mitad de la curva de respuesta a la dosis.

Para preparar 1 ml de patrón: 68,4 μl de patrón 521 fmol/pocillo en 931,6 μl de tampón de ensayo

4. Efectos de los compuestos sobre la placa

Se establecen los patrones para determinar si el compuesto utilizado en los estudios funcionales tiene algún efecto sobre la placa de 96 pocillos o si afecta a la unión de cAMP. Estos incluyen:

- Adición del compuesto en tampón de ensayo por separado para evaluar los efectos del compuesto directamente sobre la placa.
- Adición del compuesto en plasma que contiene niveles basales de cAMP para evaluar los efectos del compuesto sobre la unión de cAMP a la placa.

PATRICIA ISERN MORENO
MADRID

Se añaden concentraciones 5 nM de compuesto a cada patrón. Se elige 5 nM porque los niveles de medicamento total al final de la infusión han sido en el pasado de aproximadamente 150-300 nM. Se diluyen las muestras 1:100 antes de ensayar, por lo tanto 5 nM permite concentraciones de medicamento mayores de las esperadas al final de la infusión.

## 5. CALCULOS

El lector de placas Spectra max lee la densidad óptica (DO) a 450 nm.

La curva patrón se genera por representación del %$B/B_0$ (eje y) frente a fmol/pocillo de cAMP (eje x) en Spectra max.

El %$B/B_0$ (% unido) para cada muestra y patrón se calcula como sigue:

$B_0$ = patrón cero (véase el procedimiento 3.2).

$$\%B/B_0 = \frac{(\text{DO de patrón o muestra-DO de NSB})}{(\text{DO de } B_0 - \text{DO de NSB})} \times 100$$

El volumen fmol/pocillo puede leerse entonces directamente en la curva patrón para cada muestra. Entonces se

PATRICIA JOSE MORENO
INGLES Y ALEMAN
MADRID

convierten los valores en pmol/ml antes de tomar la media de cada par de muestras.

Conversión de valores de fmol/pocillo a pmol/ml:

fmol a pmol = dividir entre 1000
volumen en pocillo = 50 $\mu$l ... (x1000)
50
La muestra se diluye 1/100, así que en conjunto = 1 x 1000/1000 x 100/50 = 2

Así que todos los valores de fmol/pocillo se multiplican por 2 para dar pmol/ml.

## MODELO DE ENSAYO ANIMAL

### LA POTENCIACION DE LOS EFECTOS DEL 3'-5'-MONOFOSFATO DE ADENOSINA CICLICO (cAMP) DA COMO RESULTADO AUMENTOS DEL FLUJO SANGUINEO VAGINAL EN EL MODELO EN CONEJO ANESTESIADO DE EXCITACION SEXUAL.

### 1.0 Objetivos

1. Desarrollar y validar un modelo animal de excitación sexual femenina.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

2. Identificar el (los) mecanismo(s) responsable(s) de la regulación del flujo sanguíneo genital en conejo anestesiado.
3. Identificar los enfoques potenciales para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal.
4. Investigar el (los) mecanismo(s) que subyacen a la relajación del músculo liso vaginal e identificar los enfoques potenciales para la estimulación de la relajación vaginal.

## 2.0 Introducción

La respuesta de excitación sexual normal consiste en una serie de respuestas fisiológicas que se observan durante la excitación sexual. Estos cambios, como congestión vaginal, labial y clitorídea son el resultado de aumentos en el flujo sanguíneo genital. La congestión conduce a un aumento de la lubricación a través de la trasudación de plasma, aumento de la flexibilidad vaginal (relajación del músculo liso vaginal) y aumento de la sensibilidad vaginal y clitorídea.

El trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) es un trastorno sexual altamente prevalente que afecta a mujeres pre-, peri- y postmenopáusicas (±HRT). La consecuencia

PATRICIA MORENO
MADRID

primaria del FSAD es la falta de congestión o tumefacción, que se manifiesta como falta de lubricación vaginal y falta de sensación genital placentera. Las consecuencias secundarias incluyen una reducción del deseo sexual, dolor durante el coito y dificultades para conseguir un orgasmo. La causa más común de los FSAD es una reducción del flujo sanguíneo genital que se traduce en una reducción de la congestión vaginal, labial y clitorídea. (Park 1997, Goldstein 1998, Berman 1999a, Werbin 1999). Nuestro objetivo es restablecer o imitar la respuesta de excitación sexual normal en mujeres que sufren FSAD por estimulación del flujo sanguíneo genital.

En los estudios de los presentes autores se ha identificado el cAMP (3',5'-monofosfato de adenosina cíclico) como un mediador de la vasorrelajación vaginal utilizando tecnología de láser Doppler para medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo genital. Esto ha implicado desarrollar un modelo animal de excitación sexual y demostrar que los datos imitan los cambios fisiológicos observados durante la excitación sexual femenina. El modelo se ha utilizado entonces para identificar y validar mecanismos que estimulan el flujo sanguíneo genital, por ejemplo por potenciación directa o indirecta de la vasorrelajación mediada por cAMP.

PATRICIA KEEN MORENO
ING... LAN
C... 13
Teléf. 51... MADRID

## 3.0 Procedimientos

### 3.1 *Protocolo anestésico*

Se premedicaron conejos hembra de Nueva Zelanda (aproximadamente 2,5 kg) con una combinación de medetomidina (Dormitor$^{(R)}$) 0,5 ml/kg intramuscular, y ketamina (Vetalar$^{(R)}$) 0,25 ml/kg intramuscular manteniendo la toma de oxígeno con una mascarilla facial. Se traqueotomizaron los conejos utilizando un tubo endotraqueal sin boquilla Portex™ 3ID conectado a un ventilador y se mantuvieron a una tasa de ventilación de 30-40 respiraciones por minuto, con un volumen de flujo periódico aproximado de 18-20 ml y una presión máxima en las vías aéreas de 10 cm de $H_2O$. Se cambió entonces la anestesia a isoflurano y siguió la ventilación con $O_2$ a 2 l/min. Se canuló la vena marginal de la oreja derecha utilizando un catéter 23G o 24G y se perfundió una disolución Ringer con lactato a 0,5 ml/min. Se mantuvo el conejo con isoflurano al 3% durante la cirugía invasiva, bajando a 2% para la anestesia de mantenimiento.

### 3.2 *Canulación de vasos*

Se afeitó el área de la ingle izquierda del conejo y se realizó una incisión vertical de aproximadamente 5 cm de longitud a lo largo del muslo. Se expusieron la vena y la arteria femorales, se aislaron y se canularon con un catéter de PVC (17G) para la infusión de medicamentos y compuestos. Se repitió la canulación para la arteria femoral, insertando el catéter a una profundidad de 10 cm para asegurar que el catéter alcanzaba la aorta abdominal. Se unió el catéter arterial a un sistema Gould para registrar la presión sanguínea. Se tomaron muestras para análisis de gases en sangre a través del catéter arterial. Se midieron las presiones sistólica y diastólica y se calculó la presión arterial media utilizando la fórmula (diastólica x 2 + sistólica) : 3. Se midió el ritmo cardiaco mediante un oxímetro de pulsos y el sistema de software de adquisición de datos Po-ne-mah (Ponemah Physiology, Gould Instrument Systemas Inc.).

### 3.3 *Estimulación del nervio pélvico*

Se realizó una incisión ventral de línea media en la cavidad abdominal. La incisión fue de unos 5 cm de longitud justo por encima del pubis. La grasa y el músculo se apartaron directamente para descubrir el nervio hipogástrico que recorre la cavidad corporal. Era esencial mantenerse cerca del lado curvo de la pared del pubis para

PATRICIA [illegible] MORENO
MADRID

evitar dañar la vena y la arteria femorales que se encuentran por encima del pubis. Los nervios ciático y pélvico se encuentran más profundos y fueron localizados después de una disección adicional del lado dorsal del conejo. Una vez se identificó el nervio ciático, se localizó fácilmente el nervio pélvico. Encontramos que la estimulación del nervio produce un aumento del flujo sanguíneo vaginal y la inervación de la región pélvica. El nervio pélvico se liberó del tejido circundante y se colocó un electrodo estimulante Harvard dipolar alrededor del mismo. Se levantó ligeramente el nervio para proporcionar algo de tensión, después se aseguró el electrodo en la posición. Se colocó aproximadamente 1 ml de aceite de parafina ligera alrededor del nervio y el electrodo. Esto actúa como lubricante protector para el nervio y evita la contaminación de la sangre con el electrodo. Se conectó el electrodo a un estimulador Grass S88. Se estimuló el nervio pélvico utilizando los siguientes parámetros: 20V, anchura del pulso 0,5 ms, duración del estímulo 10 segundos e intervalo de frecuencia de 2 a 16 Hz. Se obtuvieron respuestas reproducibles cuando se estimuló el nervio cada 15-20 minutos.

Se determinó una curva de respuesta a la frecuencia al inicio de cada experimento para determinar la frecuencia óptima para usar como respuesta submáxima, normalmente 4 Hz. El(los) compuesto(s) a ensayar se infundieron, a través de la vena femoral, utilizando una bomba de infusión Harvard 22, permitiendo un ciclo de estimulación continuo de 15 minutos.

### 3.4 *Colocación de las sondas de láser Doppler*

Se realizó una incisión ventral de línea media en el extremo caudal del pubis para exponer el área púbica. Se expuso la pared vaginal externa por eliminación del tejido conectivo. Se insertó una sonda de flujo de láser Doppler 3 cm en la vagina, de modo que el eje de la sonda siguiera visible. Se ajustó entonces la posición de estas sondas hasta obtener una señal. Se colocó una segunda sonda justo por encima de la superficie de un vaso sanguíneo de la pared vaginal externa. Ambas sondas se fijaron en sus posiciones.

Se registró el flujo sanguíneo vaginal directamente como números a partir del medidor de flujo, utilizando el software de adquisición de datos Po-ne-mah (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument System Inc.), o indirectamente a partir de la señal del registro gráfico Gould. Se fijó la calibración al inicio del experimento (0-

62,5 ml/min/100 g tejido).

### 3.5 *Infusión de péptido intestinal vasoactivo (VIP)*

Las dosis de VIP (Bachem, H-3775) infundidas fueron 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 µg/kg intravenosas y se infundieron en un volumen de 0,5 ml de suero salino. El VIP se infundió utilizando una bomba Harvard 22, infundiendo a 500 µl/min a través de una llave de tres vías en la vena femoral. Después de la infusión de VIP, se lavó el catéter con suero salino heparinizado (Hepsalina) de modo que no quedara VIP en el catéter.

Para experimentos que utilizan infusiones de VIP, existía la necesidad de una dosis inicial de sensibilización (10 nM), para poder obtener respuestas reproducibles. Se infundió una infusión inicial de Hepsalina (50 UI/ml) que actuara como control negativo.

### 3.6 *Infusión de inhibidores*

Se prepararon inhibidores de NEP (endopeptidasa neutral EC3.4.24.11), inhibidores de fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE5) e inhibidores de PDE2 en suero salino o disolución de glucosa al 5% (200 µl de glucosa al 50% en 1,8 ml de

[illegible] MORENO [illegible] MADRID Telf. [illegible]

agua para inyecciones). Los inhibidores de PDE2 se disolvieron en una disolución de etanol al 40% (200 µl de glucosa al 50% en 1,8 ml agua/etanol para inyección). Los inhibidores y los controles de vehículo se infundieron a la misma velocidad que el VIP. Los inhibidores de NEP se dejaron durante 30 minutos antes de la curva de respuesta a la dosis de VIP, mientras que los inhibidores de NEP, antagonistas de MPY Y1 e inhibidores de PDE2 se dejaron durante 15 minutos.

### 3.7 *Medida de la relajación del músculo liso en vagina de conejo aislada*

3.7 (a). Preparación de vagina de conejo in vitro: Se sacrificaron conejos blancos hembras de Nueva Zelanda (2,0-3,0 kg) por dislocación cervical. Se abrió la cavidad abdominal y se extrajo la vagina. Se montaron longitudinalmente bandas de tejido en cámaras de órganos silanizadas de 5 ml de Wesley Co. con suturas de seda trenzada (calibre 6/0) a una tensión en reposo inicial de 1,5 Kg en tampón bicarbonato de Krebs mantenido a 37°C y gasificado con 95% $O_2$/5% $CO_2$. Se unió la ligadura superior de cada banda de tejido a un transductor de desplazamiento de fuerza de 10 g de capacidad y se midieron y registraron los cambios en la fuerza isométrica utilizando un sistema de captura de datos in vitro DART. Se dejaron equilibrar los tejidos durante 1,5 horas y se lavaron regularmente con Krebs.

3.7 (b). Relajación inducida por el péptido intestinal vasoactivo en vagina de conejo: Se contrajo cada tejido utilizando una concentración de baño 1 µM de fenilefrina. Cuando la respuesta contráctil alcanzó una meseta estable (aproximadamente 15 minutos), se añadió acumulativamente VIP a la cámara de órganos en unidades logarítmicas para producir concentraciones de 0,1 a 100 nM. Se midieron las respuestas de relajación 5 minutos después de la adición de cada concentración de VIP, consiguiéndose la máxima relajación en ese momento. Después los tejidos recibieron un agente de ensayo (por ejemplo inhibidor de NEP o de PDE) o el vehículo DMSO (control de tiempo coincidente).

3.7 (c). Análisis de datos para experimentos de relajación por VIP: Para cada curva de respuesta concentración de VIP-relajación, se expresaron las respuestas de relajación inducidas por VIP como un porcentaje de la contracción máxima inducida por fenilefrina. Estos valores se representaron entonces frente al logaritmo de la concentración de VIP y se ajustaron a curvas sigmoideas. Con fines de ajuste de curvas, se limitó la respuesta de

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID
Tel.

relajación mínima al 0% y se dejó ajustar libremente la máxima respuesta de relajación. Se determinó la concentración de VIP requerida para producir una relajación del 50% de la contracción de fenilefrina ($CE_{50\ PE}$).

3.7 (d). Relajación estimulada por campo eléctrico de vagina de conejo: Se prepararon las bandas vaginales de conejo como se ha descrito en la sección 3.7 (a). Se montaron las bandas de tejido entre dos electrodos de platino situados en la parte superior e inferior de la cámara de órganos, separados unos 4 cm. Cada tejido se contrajo utilizando una concentración de baño 1 μM de fenilefrina. Cuando la respuesta contráctil alcanzó una meseta estable (15 minutos), los tejidos experimentaron un pretratamiento de curva de relajación inducida estimulada por campo eléctrico (EFS). Este se realizó a entre 40 y 60 voltios utilizando frecuencias secuenciales de 2, 4, 8 y 16 Hz suministradas como series de 10 segundos con anchura de pulso de 0,5 ms. Se dejaron volver los tejidos a la línea base de tensión precontráctil entre cada frecuencia (5 minutos) y se registró la extensión de la respuesta de relajación.

Después de terminar el pretratamiento de curva de respuesta inducida por EFS, se lavaron todos los tejidos durante 15

MORENO

minutos, dejando a los tejidos volver a la tensión de línea base. Entonces los tejidos recibieron un agente de ensayo (por ejemplo un inhibidor de NEP o de PDE, inhibidor de óxido nítrico sintasa (NOS)) o vehículo DMSO (control de tiempo coincidente). Se recontrajeron los tejidos con fenilefrina (1 μM) 15 minutos después de la adición del compuesto o de vehículo y se determinó una curva de respuesta de relajación inducida por EFS como se ha descrito anteriormente.

Para los experimentos EFS, se complementó el medio Krebs con atropina (10 μM) y guanetidina (150 μM) para eliminar cualquier inervación colinérgica o adrenérgica de la vagina.

### 3.8 *Medida de los niveles de cAMP en vagina de conejo aislada*

Se realizó la medida de las concentraciones de cAMP a partir de extractos de tejido vaginal utilizando un estuche de enzimoinmunoensayo (EIA) de cAMP Biotrak (Amersham Life Sciences, RPN 225). Se trataron las muestras de tejido vaginal aislado con agentes de ensayo (por ejemplo forscolina o VIP). Después de 5 minutos, se congelaron inmediatamente las muestras utilizando nitrógeno líquido, se homogeneizaron y se extrajo el cAMP. Se miden los niveles de cAMP por EIA. El EIA está basado en la competición entre el cAMP sin marcar y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa para una cantidad limitada de anticuerpo específico de cAMP.

### 3.9 *Medida de la actividad fosfodiesterasa (PDE) en vagina de conejo aislada*

Se obtuvieron extractos de citosol de pared vaginal humana de ABS Inc., Delaware (edad de las donantes de 41 a 60 años). Se separaron las isoenzimas PDE por cromatografía de intercambio aniónico Mono-Q y se caracterizaron basándose en su selectividad de sustrato, su sensibilidad a moduladores alostéricos y en sus inhibidores selectivos. También se realizaron análisis Western utilizando anticuerpos de isoenzimas específicas de PDE para detectar la expresión de PDE en la vagina humana.

Todos los datos se comunican como media ± s.e.m. Los cambios significativos se identificaron utilizando ensayos de t de Student.

[illegible] MORENO
[illegible]AN
[illegible] 113
[illegible]DRID

## 4.0 Resultados y Discusión

### 4.1 *Modelo animal de excitación sexual*

En los estudios de los presentes autores se ha desarrollado un modelo reproducible y robusto de la fisiología de la excitación sexual. Utilizando este modelo de conejo anestesiado, son capaces de medir pequeños cambios del flujo sanguíneo genital utilizando tecnología de láser Doppler. La estimulación del nervio pélvico se utiliza para simular los efectos neuronales de la excitación sexual.

Se ha encontrado que la estimulación del nervio pélvico inducía aumentos dependientes de la frecuencia del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 1). Estos aumentos son significativos cuando se registran en la pared intra o extravaginal. La estimulación del nervio pélvico a 2Hz indujo una elevación media del flujo sanguíneo vaginal máximo de 10,3 ± 1,8, a 4 Hz 20,0 ± 4,6, a 8 Hz 36,3 ± 4,8 y a 16 Hz 46,6 ± 4,7 ml/min/100 g de tejido (n= 4), 15-20 V, 0,5 ms, 10 s). Estos valores son de amplitud similar a los observados anteriormente en estudios humanos y en modelos animales de excitación (Berman 1999a, Park 1997).

Se ha encontrado que la estimulación submáxima del nervio pélvico da como resultado aumentos reproducibles del flujo sanguíneo genital (por ejemplo la estimulación con 4 Hz cada 15 minutos proporcionó un aumento medio de 8,50 ± 0,10 ml/min/100 g de tejido, n= 8). Esta reproducibilidad se mantiene durante hasta 5 horas. Podemos utilizar la reproductibilidad de estas respuestas para investigar a) la identidad de los agentes/mecanismos vasoactivos endógenos que median la congestión genital y b) la influencia de los medicamentos que pueden ser eficaces en la estimulación del flujo sanguíneo vaginal.

Encontramos que no hay efectos cardiovasculares adversos asociados a la estimulación del nervio pélvico en el conejo anestesiado (véase la figura 3).

El flujo sanguíneo vaginal aumenta durante la excitación sexual (Berman, 1999) a través de un aumento del suministro de sangre arterial (la arteria vaginal, la rama vaginal de la arteria uterina, la arteria genital interna y las ramas medias de la arteria media rectal están todas implicadas en el suministro de sangre a la vagina y el clítoris). El nervio pélvico, que tiene su origen en las regiones espinales S2/S4, inerva la vagina inferior y los vasos sanguíneos relacionados. Mediante la estimulación del nervio pélvico, se puede simular los efectos sobre el flujo

[illegible] MORENO [illegible] MADRID

sanguíneo observados durante la excitación sexual, es decir, un aumento del flujo sanguíneo vaginal arterial. De forma interesante, el aumento de flujo sanguíneo arterial no se ve reflejado en un vaciado venoso que permita a las redes capilares congestionarse con la sangre. La congestión vaginal conduce a la lubricación vaginal a través de trasudación de plasma y esta es una de las primeras respuestas pélvicas observadas durante la estimulación sexual. Los neurotransmisores que se liberan con la estimulación del nervio pélvico o durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. Los nervios que contienen los neuropéptidos y otros candidatos a neurotransmisores que inervan la vasculatura y microvasculatura de la vagina y del clítoris, han sido identificados inmunohistoquímicamente. Estos estudios indican que el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), el neuropéptido Y (NPY), óxido nítrico sintasa (NOS), la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) están todos presentes en los nervios que inervan la vagina y el clítoris humanos. (Hoyle, 1996).

### 4.2 *Validación del modelo de conejo anestesiado de excitación sexual*

Para traducir los datos de flujo sanguíneo generados

PAT[illegible] MORENO
[illegible]AN
[illegible] 113
[illegible] [illegible]DRID
Telé[illegible]

utilizando este modelo a los observados en un modelo humano de excitación sexual, se comparó directamente los datos datos de los presente autores con datos de flujo sanguíneo vaginal y cardiovascular generados en estudios preclínicos.

Se ha encontrado que la infusión de VIP tiene los siguientes efectos en el modelo en conejo de excitación sexual:

- El VIP exógeno (bolo intravenoso) induce aumentos dependientes de la concentración significativos del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2a). Estos aumentos son significativamente elevados por encima de los valores de flujo sanguíneo basal cuando se registran en la pared intra o extravaginal. El flujo sanguíneo vaginal aumentó significaticamente en 24,7 ± 3,6 ml/min/100 g de tejido con una administración intravenosa de VIP (3 µg/kg). El flujo sanguíneo permaneció elevado por encima del basal durante alrededor de 11 minutos después de la infusión. Dosis menores indujeron aumentos menores, por ejemplo 0,3 µg/kg elevaron el flujo sanguíneo en 7,5 ± 1,3 ml/min/100 g de tejido y el flujo sanguíneo se elevó durante 7 minutos después de la infusión.

- Las infusiones repetidas de dosis similares de VIP

MORENO ALEMAN 13 MADRID

(intravenoso en intervalos de 30 minutos) inducen aumentos reproducibles significativos en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b).

- El VIP (intravenoso) aumenta significativamente el ritmo cardiaco y reduce la presión sanguínea arterial media (véase la figura 3). A 0,3 µg/kg de VIP (intravenoso) se produjo una reducción significativa de la presión sanguínea arterial media de 13,2 ± 0,7 mm Hg y un aumento significativo del ritmo cardiaco de 16 ± 4 latidos por minuto.

Este modelo animal refleja directamente los datos clínicos, es decir, un aumento en el flujo sanguíneo vaginal, una presión sanguínea deprimida y un ritmo cardiaco elevado. Por lo tanto, este modelo puede utilizarse para investigar el (los) mecanismo(s) que subyace(n) a los cambios fisiológicos que aparecen durante la excitación sexual y para validar además los nuevos enfoques de la estimulación del flujo sanguíneo vaginal y por ello del tratamiento de los FSAD.

### 4.3 *Cambios inducidos por el VIP en el flujo sanguíneo vaginal mediante la estimulación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa*

[illegible] MORENO
[illegible] 13
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

Ottesen y colaboradores demostraron que el VIP induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal y en la lubricación en voluntarias sanas. Sin embargo, el mecanismo por el que el VIP ejerce este efecto no está claro. En la bibliografía hay muchos ejemplos de señalización de VIP mediante diferentes segundos mensajeros, incluyendo cGMP/guanilato ciclasa (Ashur-Fabian, 1999), monóxido de carbono/hemo oxigenasa (Fan, 1998) y cAMP/adenilato ciclasa (Schoeffer, 1985, Gu, 1992, Foda, 1995). Esto se ejemplifica por un reciente artículo que describe cómo los efectos relajantes de VIP en la arteria uterina pueden explicarse por la liberación de óxido nítrico (Jovanovic, 1998). De forma interesante, existen también evidencias de que NO/cGMP modula el VIP en la función urogenital masculina (Kim, 1994) y existen evidencias directas de que el tratamiento de cultivos celulares de músculos lisos vaginales humanos con VIP (0,5 µM) no consigue elevar los niveles de cAMP (Traish, 1999, ibidem).

En este estudio los presentes autores han mostrado que el VIP induce la vasorrelajación mediante la elevación de los niveles de cAMP intracelular. Realizando una serie de experimentos funcionales se ha medido el flujo sanguíneo y la relajación del músculo liso además de medir bioquímicamente las concentraciones de cAMP intracelular.

PATRICIA [illegible] MORENO
ING. [illegible] MAN
c [illegible] 113
Telf. [illegible] - MADRID

934

Se ha utilizado forscolina, un activador de adenilato ciclasa, o un mimético de cAMP, para imitar los efectos de la activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa. El VIP y la forscolina tienen efectos idénticos sobre los efectos fisiológicos de la excitación sobre el flujo sanguíneo vaginal y la relajación.

El VIP (1 µg/kg) y la forscolina (40 nmol/kg) inducen aumentos significativos del flujo sanguíneo vaginal, 13,2 y 12,7 ml/min/100 mg de tejido respectivamente (véase las figuras 2a y 4a). Estos cambios en la amplitud inducida por VIP y forscolina no eran significativamente diferentes. Estos aumentos son significativamente elevados por encima de los valores de flujo sanguíneo basal registrados en la pared intra- o extravaginal.

El VIP (0,1 µM) y la forscolina (10 µM) aumentaron ambos significativamente las concentraciones intracelulares de cAMP por encima de los niveles basales en tejido vaginal aislado (véase la figura 4b).

El VIP (0,1 µM) y la forscolina (10 µM) elevan las concentraciones basales de 276 nM en un 156% y un 238%, respectivamente. Las diferencias en estos porcentajes reflejan la diferencia de concentraciones de VIP y

MORENO
MAN
RID

forscolina utilizados, por ejemplo el VIP a una concentración de 0,1 µM relaja la vagina aislada precontraída aproximadamente un 80%, mientras que la forscolina 10 µM es suficiente para relajar completamente el tejido aislado.

Además, los presentes autores muestran que el VIP y la forscolina inducen la relajación en tejido vaginal aislado con valores de $CE_{50}$ de 18,8 ± 0,6 nM y 320 ± 20 nM respectivamente (véase la figura 4c).

Estos datos establecen que el VIP induce la vasorrelajación vaginal a través de la ruta cAMP/adenilato ciclasa, por ello este modelo puede utilizarse para investigar si la estimulación del nervio pélvico, es decir la excitación sexual, conduce a la liberación de VIP/activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa. Además, pueden investigarse los enfoques para estimular el flujo sanguíneo vaginal durante la excitación sexual, por ejemplo estimulando directa o indirectamente la señalización de cAMP.

### 4.4 *cAMP es el mediador de la vasorrelajación vaginal*

Los candidatos a neurotransmisor y segundo mensajero responsables de los aumentos del flujo sanguíneo vaginal

[illegible] MORENO

durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. Hasta la fecha, los investigadores se han centrado en la ruta del óxido nítrico (NO)/cGMP. Según la presente invención, se ha demostrado que: 1) la ruta cAMP/adenilato ciclasa media los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal. 2) el VIP es un neurotransmisor endógeno liberado durante la excitación sexual y 3) el VIP liberado endógenamente induce efectos vasorrelajantes mediante la elevación de los niveles de cAMP.

El neurotransmisor responsable de la relajación de la pared vaginal está actualmente sin identificar. Los presentes autores han mostrado que el VIP es el neurotransmisor que se libera por estimulación del nervio pélvico y que cAMP media la vasorrelajación mediada por VIP. Los agentes que evitan el metabolismo de VIP o que estimulan directamente la señalización de cAMP, potencian los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal, por ejemplo inhibidores de NEP o inhibidores de $PDE_{cAMP}$, respectivamente (véanse las siguientes secciones).

En los estudios de los presente autores se ha encontrado que se puede excluir el papel del NO en la relajación vaginal inducida por VIP. A este respecto, hemos mostrado

MORENO
MAN
113
MADRID
Telf.

que un potente y selectivo inhibidor de PDE de tipo 5 no tiene efecto sobre los aumentos estimulados por nervio pélvico o inducidos por VIP en el flujo sanguíneo vaginal (-5,3 ± 5,5% de cambio en el flujo sanguíneo a 60 $\mu$g/kg). Además, el inhibidor de PDE de tipo 5 tiene un efecto mínimo sobre las relajaciones inducidas por VIP o estimuladas por campo eléctrico (EFS) de músculo liso vaginal aislado (estimulaciones del 30% de relajaciones inducidas por VIP, véase la tabla 1).

Tabla 1: Estimulación de la relajación mediada por VIP de vagina de conejo aislada. Esta tabla ilustra el porcentaje de estimulación de la $CE_{50}$ para relajaciones mediadas por VIP de músculo liso vaginal precontraído (fenilefrina 1$\mu$M). Los inhibidores selectivos de $PDE_{cAMP}$ de tipos 1, 2, 3 y 4 potenciaron todos significativamente las relajaciones mediadas por VIP, mientras que un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 5 o un control de vehículo no tuvieron efecto sobre las relajaciones mediadas por VIP.

[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] MADRID

938 F

| Inhibidor de PDE a dosis selectiva | Porcentaje de estimulación de la relajación inducida por VIP |
|---|---|
| $\text{PDE}_{cAMP}$ de tipo 1 | 210% |
| $\text{PDE}_{cAMP}$ de tipo 2 | 130% |
| $\text{PDE}_{cAMP}$ de tipo 3 | 220% |
| $\text{PDE}_{cAMP}$ de tipo 4 | 160% |
| $\text{PDE}_{cAMP}$ de tipo 5 | Sin efecto (30%) |
| Control de vehículo | Sin efecto |

Los presentes autores han mostrado que el VIP es también el neurotransmisor endógeno NANC (no adrenérgico, no colinérgico) parcialmente responsable de las relajaciones inducidas por EFS de músculo liso vaginal aislado. Una dosis elevada de inhibidor de óxido nítrico sintasa (L-NOARG, 300 μM) inhibe sólo el 50% de las relajaciones inducidas por EFS. Un inhibidor de NEP (1 μM) que evitará el metabolismo de VIP inducido por NEP, y que por lo tanto estimula la señalización de VIP, estimula la relajación NANC, que no depende de óxido nítrico, inducida por EFS. Han mostrado que tanto NO como VIP regulan el tono del músculo liso de la pared vaginal. Terapéuticamente será posible estimular las relajaciones del músculo liso vaginal

MORENO
JUAN
113
MADRID
Telf.

con agentes que estimulan la señalización mediada por NO/cGMP y/o VIP/cAMP.

### 4.5 *El flujo sanguíneo vaginal es estimulado por agentes farmacológicos que elevan directa o indirectamente los niveles de cAMP.*

FSAD está asociado a, y puede dar como resultado, una reducción del flujo sanguíneo genital. Los enfoques potenciales para tratar esta enfermedad giran alrededor de la estimulación del flujo sanguíneo genital. Habiendo establecido que cAMP es el mediador de la vasorrelajación genital y que las elevaciones de cAMP que resultan del VIP liberado neuronalmente, los presentes autores creen que si se estimula la señalización de cAMP, como consecuencia aumentará el flujo sanguíneo genital, restableciendo así el flujo sanguíneo genital a niveles normales y tratando el FSAD. Hemos elegido inicialmente tres objetivos para estimular directa o indirectamente la vasorrelajación mediada por cAMP: los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ (por ejemplo inhibidore de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2, inhibidores de NEP (EC 3.4.24.11) y antagonistas de receptor de neuropéptido Y Y1 (NPY Y1).

### 4.5.1 Inhibidores de endopeptidasa neutra (NEP EC

3.4.24.11)

La NEP EC 3.4.24.11 metaboliza el VIP y por ello finaliza la actividad biológica mediada por VIP. Los inhibidores de NEP potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del VIP liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión genital.

No ha habido informes previos en la bibliografía sobre la localización de NEP EC 3.4.24.11 o de su papel funcional en el tejido vaginal o de su papel en la excitación sexual.

Los inhibidores selectivos de NE EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 5).

Un inhibidor de NEP estimulaba el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal hasta un 53% comparado con los aumentos del control coincidente en el tiempo. Esta potenciación de las frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4 Hz), era dependiente de la dosis, por ejemplo 0,1 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 35,0 ± 7,6%, 0,3 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 42,6 ± 27,7% y 1,0 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 52,8 ±

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible], 113
[illegible] MADRID

941

32,5%. Los inhibidores de NEP no tuvieron efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (sin estimular). Por ello, los agentes de la presente invención estimulan la excitación potenciando la señalización de cAMP, más que induciendo la excitación en ausencia de deseo sexual, es decir por aumento directo de la señalización de cAMP.

Los inhibidores selectivos de NE EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos inducidos por el VIP del flujo sanguíneo vaginal comparados con los controles de tiempo coincidente. A dosis submáximas de VIP (por ejemplo 0,3 µg/kg) hay una potenciación significativa tanto en el aumento del pico (95 ± 6%) como de la prolongación de la duración de la estimulación (alrededor de 140%, desde 7 hasta más de 17 minutos, véase la figura 7). Los inhibidores de NEP prolongan significativamente la duración de la elevación inducida por VIP del flujo sanguíneo vaginal cuando se proporcionan en combinación con una dosis de VIP que produce los aumentos de flujo máximos (aproximadamente un 80% de aumento en una duración de 11 a 20 minutos).

Los inhibidores de NEP a dosis clínicamente relevantes estimulan significativamente las relajaciones inducidas por VIP y mediadas por nervio en tejido aislado. La $CE_{50}$ de VIP

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

se reduce significativamente de 18,8 ± 0,6 nM a 2,9 ± 0,3 nM en presencia de un inhibidor selectivo de NEP (1 μM). El efecto del inhibidor de NEP es dependiente de la concentración.

Se expresan el RNA mensajero y la proteína de NEP EC 3.4.24.11 y se han identificado en vagina humana y de conejo por análisis Northern y Western.

### 4.5.2 Inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE)

El cAMP es degradado por la PDE hidrolizante de cAMP, es decir, $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$. Los inhibidores de $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del cAMP liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No hay informes en la bibliografía sobre la localización de $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ o sobre un papel funcional de estas isoenzimas en tejido vaginal, o de un papel en la excitación sexual. Los presentes autores han mostrado, por perfiles de PDE de vagina humana y de conejo, que están presentes las siguientes isoenzimas de $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ 1, 2, 3, 4, 7 y 8. Los inhibidores de estas $\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ representan agentes potenciales para estimular el flujo sanguíneo vaginal y/o relajar el

[illegible] MORENO
[illegible]AN
[illegible]3
[illegible]RID

músculo liso vaginal.

Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 a dosis clínicamente relevantes potencia significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 8). Un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 (500 µg/kg, intravenoso) estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal en 86,8 ± 21,9% comparado con el aumento observado durante el control coincidente en el tiempo (a 4 Hz).

Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimuló significativamente la duración del aumento inducido por VIP del pico de flujo sanguíneo vaginal por encima del 100% (medido a una amplitud del 50%, véase la figura 7). El inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimuló significativamente el aumento del pico del flujo sanguíneo inducido por estimulación del nervio pélvico (aproximadamente 15 ± 3% [200 µg/kg] a 4 Hz).

Los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ estimulan las relajaciones inducidas por VIP de músculo liso vaginal aislado precontraído (fenilefrina 1 µM, véase la tabla 1). Los inhibidores selectivos de $PDE_{cAMP}$ de tipos 1, 2, 3 y 4 potenciaban todos significativamente las relajaciones

mediadas por VIP (210% a 76 nM, 130% a 8 nM, 220% a 3,4 μM y 160% a 686 nM de potenciación de los valores de VIP $CE_{50}$). Estos inhibidores se administraron a dosis que se sabían selectivas para el $PDE_{cAMP}$ de interés. El inhibidor selectivo de $PDE_{cGMP}$ de tipo 5 o el control de vehículo no tenían un efecto viable en las relajaciones mediadas por VIP.

### 4.5.3 Antagonistas del receptor de NPY Y1

El NPY ejerce una influencia inhibitoria sobre la vasorrelajación mediada por VIP y los antagonistas del receptor de NPY Y1 facilitarán el efecto vasorrelajante del VIP endógeno liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No existen informes en la bibliografía sobre la localización del receptor de NPY o de un papel funcional para estos receptores en tejido vaginal o un papel en la excitación sexual.

Los estudios de expresión del receptor de NPY han identificado por análisis Northern y Western que los subtipos de receptor de NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$ están presentes en vagina humana y de conejo.

PATENTES [illegible] MORENO
INGL [illegible] AN
[illegible] RID
C [illegible]
Tel. [illegible]

Los inhibidores selectivos de NPY Y1 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 10). Un antagonista de NPY Y1 estimuló el aumento de pico del flujo sanguíneo vaginal hasta un 92% comparado con los aumentos del control coincidentes en el tiempo. Esta potenciación de las frecuencias submáximas de estimulación (por ejemplo 4 Hz) era dependiente de la dosis, por ejemplo, 0,01 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 15,8 ± 19,6%, 0,03 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 35,1 ± 17,17%, 0,10 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 60,1 ± 16,9% y 0,3 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 91,9 ± 27,4% (media ± s.e.m., n= 3). Los antagonistas de NPY Y1 no tuvieron efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (sin estimular). Esto refuerza la creencia de los presentes autores de que estimularán la excitación potenciando la señalización de cAMP, más que induciendo la excitación en ausencia de deseo sexual, es decir por aumento directo de la señalización de cAMP.

### 4.6 *Efectos de los agentes que estimulan cAMP o que aumentan el flujo sanguíneo vaginal sobre la presión sanguínea arterial media en conejo anestesiado.*

PATENTES ... MORENO
... RID
Tel.

946

En la búsqueda de una terapia oral para FSAD, es deseable que no haya efectos cardiovasculares adversos asociados, por ejemplo efectos sobre la presión sanguínea o sobre el ritmo cardiaco. En los estudios de los presentes autores se ha encontrado que las infusiones de VIP reducen significativamente la presión sanguínea arterial media (véase la figura 3) y aumentan significativamente el ritmo cardiaco. Por ello, en un agente altamente preferido, el agente no es VIP. La estimulación del nervio pélvico y los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ y de NEP, sin embargo, no tuvieron efecto sobre la presión sanguínea. A 0,3 µg/kg (intravenoso), el VIP produjo un aumento significativo del ritmo cardiaco de 16 ± 4 latidos por minuto. A dosis mayores tal como 3,0 µg/kg (intravenoso), el VIP produjo una reducción significativa en la presión sanguínea arterial media de 14,7 ± 1,37 mm Hg y esto se asoció a un aumento significativo del ritmo cardiaco de 111 ± 30 latidos por minuto, lo que aumentó entonces la presión sanguínea arterial media a 8,5 ± 1,4 mm Hg.

## COMPUESTOS ENSAYADOS

Se ensayaron una serie de los compuestos mencionados anteriormente según la presente invención y se encontraron eficaces según la presente invención, es decir, pueden

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID

actuar como $P_{cAMP}$ para tratar FSD, en particular FSAD.

Estos compuestos incluían:

El compuesto de fórmula Ia ("FIa") es 5-[4-(dietilamino)bencil]-1-metil-3-propil-6,7-dihidro-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona. El FI puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0911333 (ejemplo 50 de éste).

El compuesto de fórmula II ("FII") es 9-(1-acetil-4-feinlbutil)-2-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona. El FII puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0771799 (ejemplo 100 de éste).

El compuesto de fórmula III ("FIII") es milrinone. El FIII es un producto comercialmente disponible.

El compuesto de fórmula IV ("FIV") es rolipram. El FIV es un producto comercialmente disponible.

El compuesto de fórmula V ("FV") es éster 3-[[[1-(2-carboxi-4-pentenil)ciclopentil]carbonil]amino]-1-etílico del ácido ciclohexanocarboxílico. El FV puede prepararse

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MAN
113
MADRID
Telf

948

según las explicaciones del documento EP-A-0274234 (ejemplo 300 de éste).

El compuesto de fórmula VI ("FVI") es éster 3-[[[1-(2-carboxi-4-pentenil)ciclopentil]carbonil]amino] del ácido ciclohexanocarboxílico. El FVI puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0274234 (ejemplo 379 de éste).

En particular, los compuestos FIa, FII, FIII y FIV son inhibidores de $\text{PDE}_{cAMP}$. FIa es un I:PDEI, FII es un I:PDEII, FIII es un I:PDEIII y FIV es un I:PDEIV.

Los datos para estos compuestos se presentan anteriormente en las secciones de ejemplos anteriores, por ejemplo véase la tabla 1.

Como resulta evidente, estos inhibidores de $\text{PDE}_{cAMP}$ estimulan las relajaciones inducidas por VIP de tejido aislado.

El FII, que es un I:PDEII selectivo, estimula los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relevantes.

PATRICIA KOEHN MORENO
MADRID

El FII potencia también los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI son inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11.

Los datos presentados anteriormente en las secciones de ejemplos anteriores son para el FVI. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares para el FV.

Como resulta evidente, el FV y el FVI estimulan los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI potencian también los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI estimulan también las relajaciones inducidas por VIP y mediadas por el nervio de tejido aislado a dosis clínicamente relevantes.

PATRICIA [illegible] MORENO
ING[illegible] Y [illegible]AN
[illegible], 113
[illegible]ADRID
Tel. [illegible]

CONCLUSIONES

Los presentes autores han desarrollado un modelo animal que imita la respuesta de excitación fisiológica obervada durante la excitación sexual femenina y que refleja directamente los datos clínicos obtenidos en voluntarias humanas. El modelo utiliza tecnologías de láser Doppler para registrar pequeños cambios en el flujo sanguíneo vaginal inducidos por la estimulación del nervio pélvico o por neurotransmisores vasoactivos. Durante la excitación sexual, existe un aumento del flujo sanguíneo genital resultante del aumento de inervación del nervio pélvico. El aumento estimulado por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal observado en el modelo animal representa los efectos vasculares endógenos observados durante la excitación sexual femenina. Por lo tanto, este modelo puede utilizarse en primer lugar para identificar los mecanismos implicados en la regulación del flujo sanguíneo vaginal y, en segundo lugar, para validar nuevos enfoques para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal.

Este estudio ha utilizado exitosamente una combinación de técnicas in vivo, in vitro y bioquímicas para identificar al cAMP como el mediador/segundo mensajero que regula la vasorrelajación vaginal (y la relajación de la pared

PATRICIA ROCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. [illegible], 113
Telef. 519 50 90 - MADRID

vaginal). Utilizando este modelo animal, se ha demostrado que se libera el VIP durante la estimulación del nervio pélvico, y que los inhibidores de la enzima responsables del metabolismo del VIP, los NEP, son capaces de estimular los aumentos del flujo sanguíneo vaginal estimulados por el nervio. Se ha mostrado que los aumentos mediados por el VIP del flujo sanguíneo vaginal son el resultado de la elevación del cAMP del tejido, mientras que anteriormente se había mostrado que el VIP aumentaba el flujo sanguíneo vaginal en voluntarias sanas, pero el mecanismo celular no estaba identificado. Además, se ha demostrado que el flujo sanguíneo vaginal puede estimularse directamente con un mimético de cAMP o indirectamente elevando las concentraciones de cAMP.

La causa principal de los FSAD es una reducción del flujo sanguíneo genital y esta se manifiesta como una reducción de la congestión vaginal, labial y clitorídea. El tratamiento de mujeres con FSAD es factible restableciendo la respuesta de excitación sexual normal. Esto puede conseguirse estimulando el flujo sanguíneo genital. El enfoque de los presentes autores para el tratamiento de los FSAD será estimular la respusta de excitación sexual normal, y opcionalmente el flujo sanguíneo vaginal/lubricación, por potenciación directa o indirecta

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. [illegible] 113
Telf. [illegible] - MADRID

952

de la señalización de cAMP endógeno, por ejemplo con un inhibidor de NEP (EC 3.4.24.11), o un inhibidor de PDE hidrolizante de cAMP o un antagonista de receptor de NPY. Esto tendrá el efecto genérico de restablecer o imitar la respuesta de excitación normal sin efectos secundarios cardiovasculares. Se potenciará la excitación sexual/congestión, más que inducirla simplemente en ausencia de estímulo sexual, que puede ser el caso con algunos agentes vasoactivos administrados exógenamente, por ejemplo el VIP.

Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente como referencia. Diversas modificaciones y variaciones de los procedimientos y del sistema descritos en la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin salirse del alcance y espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención se describe en conexión con realizaciones preferidas específicas, debe comprenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. Es más, están previstas diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en bioquímica y biotecnología o campos relacionados, dentro del alcance de las siguientes

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMAN
c. [illegible], 113
Telef. [illegible] - MADRID

reivindicaciones.

REFERENCIAS DEL TEXTO GENERAL

Ashur-Fabian, O., Perl. O., Lilling. G., et al., (1999) SNV, a lipophilic superactive VIP analogue, acts through cGMP to promote neuronal survival. *Peptides*, **20**, 629-633.

Berman, J.R., Berman, L. & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: Incidence, pathophysiology, evaluation and treatment options. *Urology*, **54**, 385-391.

Berman, J., Goldstein, I., Werbin, T. et al., (1999a). Double blind placebo controlled study with crossover to assess effect of sildenafil on physiological parameters of the females sexual response. *J. Urol.*, **161**, 805.

*Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV*, American Psychiatric Association, Washington DC. 1987, pág. 493-518.

Fan, Y.P., Chakder, S. & Ratton, S. (1999). Inhibitory effect of zinc protoporhyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal polypeptide and other receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp.*

PATRICIA BOSCH MORENO
ING. ... ALEMAN
... 113
MADRID
Telé...

*Ther.*, 285, 468-474.

Foda, H.D., Sharaf, H.H., Absood, A. et al. (1995). Pituitary adenilate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides*, 16, 1057-1061.

Frank, E., Anderson, C. & Rubinstein, D. (1978). Frequency of sexual dysfunction in "normal" couples. *N. Engl. J. Med.*, 229, 111-115.

Goldstein, I. & Berman, J.R: (1998). Vasculogenic female sexual dysfunction: vaginal engorgement and clitoral erectile insufficiency syndromes. *Int. J. Impot. Res.*, 10, S84-S90.

Gu, Z.F., Jensen, R.T. & Matton, P.N. (1992). A primary role for protein kinase A in smooth muscle relaxation induced by adrenergic agonists and neuropeptides. *Am. J. Physiol.*, 263, G360-G364.

Hoyle, C.H.V., Stones, R.W., Robson, T. et al. (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide containing nerves. *J. Anat.*, 188, 633-644.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] ALEMAN
[illegible] 13
[illegible] RID
Tel. [illegible]

Ingenhoven, N. & Beck-Sickinger, A.G. (1997). Fluorescent labelled analogues of neuropeptide Y for the characterisation of cells expressing NPY receptor subtypes. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, 17, 407-418.

Jovanovic, A., Jovanovic, S., Tulic, I. et al (1998). Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Human. Reprod.*, 4, 71-76.

Kaplan, H.S. (1974). The New Sex Therapy. Londres. Bailliere Tindall.

Kaplan, S.A., Reis, R.B., Kohm, I.J. et al. (1999). Safety and efficacy of sildenafil in postmenopausal women with sexual dysfunction. *Urology*, 53, 481-486.

Kim, Y.C., Choi, H.K., Ahn, Y.S., et al. (1994). The effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on rabbit cavernosal smooth muscle contractility. *J. Androl.*, 15, 392-739.

Laan, E. & Everaerd, W. (1988). Physiological measures of vaginal vasocongestion. *Int. J. Impot. Res.*, 10, S107-S110.

[illegible] MORENO
[illegible]AN
[illegible]RID

956

Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, 10, S104-S106.

Levin, R.J. (1980). The physiology of sexual function in women. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 7, 213-252.

Levin, R.J. (1991). VIP, vagina, clitoral and preurethral glans: An update on female genital arousal. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 98, 61-69.

Levin, R.J. (1992). The mechanisms of human females sexual arousal. *Ann. Rev. Sex. Res.*, 3, 1-48.

Levin, R.J. & Wagner, G. (1986). TRH and vaginal blood flow-effects in conscious women and anaesthetised sheep. *J. Physiol.*, 373, 83p.

Lunberg, J.M., Modin, A. & Malmstrom, R.E. (1996), Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17, 301-304.

Masters, W.H., Johnson, V.E. *Human Sexual Response*, Little, Brown: Boston, 1996.

[illegible] MORENO
[illegible] LEMAN
[illegible] 13
[illegible] ADRID
Tel.

957

Ottesen, B., Gerstenberg, T., Ulrichsen, H. et al. (1983). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases vaginal blood flow and inhibits smooth muscle activity in women. *Eur. J. Clin. Invest.*, 13, 321-324.

Ottesen, B., Wagner, G. & Fahrenkrug, J. *Peptide innervation of the sexual organs*. En: Handbook of Sexology, vol. 6, The Pharmacological and Endocrinology of Sexual Function, Sitsen, J.M.A. (ed). Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1988), capítulo 4, pág. 66-97.

Ottensen, B., Pedersen, B., Nielsen, J. et al. (1987). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides*, 8, 797-800.

Park, K., Goldstein, I., Andry, C., et al (1997). Vasculogenic female sexual dysfunction: the hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. *Int. Impotence Res.*, 9, 27-37.

Rosen, R., Taylor, J., Leiblum, S. et al. (1993). Prevalence of sexual dysfunction in women: results of a survey of 329 women in an outpatient gynecological clinic. *J. Sex. Marital. Ther.*, 19, 171-188

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 13
ADRID

Schiavi, R.C. & Seagraves, R.T. (1995). The biology of sexual function. *Psychiat. Clin. North. Am.*, 18, 7-23.

Schoeffter, P. & Stoclet, J.C. (1985). Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 109, 275-279.

Serradeil-Le Gal, C., Valette, G. Rouby, P.E. et al. (1995). SR 120819A, an orally active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Letters*, 3, 192-196.

Sjoberg, I. (1992). The vagina: Morphological, functional and ecological aspects. *Acta Obst. Gynecol. Scand.*, 71, 84-85.

Spector, I.P. & Carey, M.P. (1990). Incidence and prevalence of sexual dysfunctions: a critical review of empirical literature. *Arch. Sex. Behav.*, 19, 389-408.

Wagner, G. (1992). Aspects of genital physiology and pathology. *Sem. Neurol.*, 12, 87-97.

Werbin, T., Salimpour, P., Berman, L, et al (1999). Effect

PAT [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 13
[illegible] ADRID
Telf [illegible]

of sexual stimulation and age on genital blood flow in women with sexual stimulation. *J. Urol.*, 161, 688.

Wincze, J.P., Albert, A. & Bansal, S. (1993). Sexual arousal in diabetic females: Physiological and self-report measures. *Arch. Sex Behav.*, 22, 587-601.

Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M. et al (1995). Subtype selectivity and antagonist profile of nonpeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275, 143-9.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION PDE

1. Han, P., Fletcher, C.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Yaremko, L.M., Michaeli, T. Assignemt of the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3 and of the human PDE7A gene to chromosome 8q13. Genomics 48: 275-276, 1998.

2. Michaeli, T., Bloom, T.J., Martins. T., Loughney, K., Ferguson, K., Riggs, M., Rodgers, L. Beavo, J.A., Wigler, M.: Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phophodiesterase by complementation

of cAMP phosphodiesterase-deficient Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem., 268: 12925-12932, 1993.

3. Milatovich, A., Bolger, G., Michaeli, T., Francke, U.: Chromosome localization of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse. Somat. Cell. Molec. Genet. 20:75-86, 1994.

4. Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K., Loughney, K.: Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3-prime, 5-prime-cyclic nucleotide phophodiesterase. Gene 191: 89-95, 1997.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NEP

1. Barker, P.E., Shipp, M.A., D'Adamio, L., Masteller, E.L., Reinherz, E.L. The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3(q21-q27). J. Immun. 142:283-287, 1989.

2. D'Adamio, L., Shipp, M.A., Masteller, E.L., Reinherz, E.L.: Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5-prime

untranslated regions. Proc. Nat. Acad. Sci. 86:7103-7107, 1989.

3. Letarte, M., Vera, S., Tran, R., Addis, J.B.L., Onizuka, R.J., Quackenbush, E.J., Jongheel, C.V., McInnes, R.R:: Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. J. Exp. Med. 168:1247-1253, 1988.

4. Shipp, M.A., Vijayaraghavan, J., Schmidt, E.V., Masteller, E.L., D'Adamio, L., Hersh, L.B., Reinherz, E.L.: Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. 86:297-301, 1989.

5. Tran-Paterson, R., Willard, H.F., Letarte, M.: The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 3.4.24.11) gene is located on human cromosome 3. Cancer Genet. Cytogenetic. 42:129-134, 1989.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPY

1. Allen, J.M., Bloom, S.R.: Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8:1-8, 1986.

MORENO
MAN
13
MADRID

2. Bahary, N., Zorich, G., Pachter, J.E., Leibel, R.L., Friedman, J.M.: Molecular genetic linkage maps of mouse chromosomes 4 and 6. Genomics 11:33-47, 1991.

3. Baker, E., Hort, Y.J., Ball, H., Sutherland, G.R., Shine, J., Herzog, H.: Assignment of the human neuropeptide Y gene to chromosome 7p15.1 by nonisotopic in situ hybridization. Genomics 26:163-164, 1995.

5. Carr, L.G., Foroud, T., Bice, P., Gobbert, T., Ivashina, J., Edenberg, H., Lumeng. L., Li, T.K.: A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. Alcohol Clin. Exp. Res. 22:884-887, 1998.

5. Dockray, G.J.: Neuropeptide Y: in search of a function. Neurochem. Int. 8:9-11, 1986.

6. Erickson, J.C., Clegg., K.E., Palmiter, R.D.: Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. Nature 381: 415-421, 1996. PubMed ID: 8632796.

7. Erickson, J.C., Hollopeter, G., Palmiter, R.D.: Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274: 1704-1706, 1996.

8. Karvonen, M.K., Pesonen, U., Koulu, M., Niskanen, L., Laakso, M., Rissanen, A., Dekker, J.M., t'Hart, L.M., Valve, R., Uusitupa, M.I.: Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. Nature Med. 4:1434-1437, 1998.

9. Maccarrone, C., Jarrott., B.; Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8:13-22, 1986.

10. Meisler, M.H., Spence, J.E., Dixon, J.E., Caldwell, R.M., Minth, C.D., Beaudet, A.L.: Exclusion of close linkage between the loci for cystic fibrosis and neuropeptide Y on human cromosome 7. Cytogenet. Cell Genet. 44:175-176, 1987.

11. Minth, C.D., Andrews, P.C., Dixon, J.E.: Characterization, sequence and expression of the cloned human neuropeptide Y gene. J. Biol. Chem. 261:11974-11979, 1986.

12. Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M., Dixon, J.E.: Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptidase tyrosine. Proc. Nat. Acad. Sci. 81:4577-4581, 1984.

MADRID

13. Takeuchi, T., Gumucio, D., Eddy, R., Meisler, M., Minth, C. Dixon, J., Yamada, T., Shows, T.: Assignment of the related pancreatic polypeptide (PPY) and neuropeptide Y (NPY) genes to regions on human chromosomes 17 and 7. (Resumen) Cytogenet. Cell. Genet. 40:759 sólo, 1985.

14. Takeuchi, T., Gumucio, D.L., Yamada, T., Meisler, M.H., Minth, C.D., Dixon, J.E., Eddy, R.E., Shows, T.B.: Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. J. Clin. Invest. 77:1038-1041, 1986.

15. Terenghi, G., Polak, J.M., Hamid, Q., O'Brien, E., Denny, P., Legon, S., Dixon, J., Minth, C.D., Palay, S.L., Yasargil, G., Chan-Palay, V.: Localization of neuropeptide Y mRNA in neurons of human cerebral cortex by means of in situ hybridization with a complementary RNA probe. Proc. Nat. Acad. Sci. 84:7315-7318, 1987.

16. Thiele, T.E., Marsh, D.J., Ste. Marie, L., Bernstein, O.L., Palmiter, R.D.: Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. Nature 396:366-369, 1998.

17. Uusitupa, M.I.J., Karvonen, M.K., Pesonen, U., Koulu,

MORENO
13
RID

M.: Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism. Ann. Med. 30:508-510, 1998.

REFERENCIAS PARA LA SECCION NPYR1

1. Herzog, H., Baumgartner, M., Vivero, C., Selbie, L.A., Auer, B., Shine, J.: Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor. J. Biol. Chem. 268:6703-6707, 1993.

2. Herzog, H., Darby, K., Ball, H., Hort, Y., Beck-Sickinger, A., Shine, J.: Overlapping gene stucture of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests coordinate transcriptional regulation, Genomics 41:315-319, 1997.

3. Herzog, H., Hort, Y.J., Ball, H.J., Hayes, G., Shine, J., Selbie, L.A.: Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. Proc. Nat. Acad. Sci. 89:5974-5798, 1992.

4. Larhammar, D., Blomqvist, A.G., Yee, F., Jazin, E., Yoo, H., Whalestedt, C.: Cloning and functional expression of

MORENO
MAN
113
MADRID

a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. J. Biol. Chem. 267:10935-10938, 1992.

5. Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson, D.A.: Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41:498-500, 1997.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPYR2

1. Ammar, D.A., Eadie, D.M., Wong, D.J., Ma, Y.-Y., Kolakowski, L.F. Jr., Yang-Feng, T.L., Thompson, D.A.: Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide Y receptor gene. Genomics 38:392-398, 1996.

2. Gerald, C., Walker, M.W:, Vaysse, P., J.-J., He, C., Brancheck, T.A., Weinsahnk, R.L.: Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. J. Biol. Chem. 270: 26758-26761, 1995.

3. Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson, D.A.: Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome

4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

4. Rose, P.M., Fernandes, P., Lynch, J.S., Frazier, S.T., Fisher, S.M., Kodukula, K., Kienzle, B., Seethala, R.: Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. J. Biol. Chem. 270:22661-22664, 1995.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VIP

1. Bodner, M., Fridkin, M. Gozes, I.: Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3548-3551, 1985.

2. Gotoh, E., Yamagami, T., Yamamoto, H., Okamoto, H.: Chromosomal assignment of human VIP/PHM-27 gene to 6q26-q27 region by spot blot hybridization and in situ hybridization. Biochem. Int. 17:555-562, 1988.

3. Gozes, I., Avidor, R., Yahav, Y., Katznelson, D. Croce, C.M., Huebner, K.: The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21-6qter. Hum. Genet. 75:41-44, 1987.

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 13
[illegible] RID
Tel. [illegible]

4. Gozes, I., Nakai, H., Byers, M., Avidor, R., Weinstein, Y., Shani, Y., Shows, T.B.: Sequential expression in the nervous system of C-MYB and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24. Somat. Cell. Molec. Genet. 13:305-313, 1987.

5. Heinz-Erian, P., Dey. R.D., Flux, M. Said, S.I.: Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. Science 229: 1407-1408, 1985.

6. Itoh, N., Obata, K., Yanaihara, N., Okamoto, H.: Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature 304:547-549, 1983.

7. Linder, S., Barkhem, T., Norberg, A., Persson, H., Schalling, M., Hokfelt, T., Magnusson, G.: Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. Proc. Nat. Acad. Sci. 84:605-609, 1987.

8. Omary, M.B., Kagnoff, M.F.: Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line. Science 238: 1578-1581, 1987.

PATRICIA KOCH MORENO
ING. [illegible] MAN
[illegible] 13
[illegible] RID
Tel. [illegible]

## REFERENCIAS PARA LA SECCION AC

1. Parma, J., Stengel, D., Gannage, M.-H., Poyard, M., Barouki, R., Hanoune, J.: Sequence of a human brain adenylyl cyclase partial cDNA: evidence for a consensus cyclase domain. Biochem. Biophys. Rs. Commun. 179:455-462, 1991.

2. Stengel, D., Parma, J., Gannage, M.-H., Roeckel, N., Mattei, M.-G., Barouki, R., Hanoune, J.: Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. Hum. Genet. 90:126-130, 1992.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VPAC1

1. Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Darmoul, D., Maoret, J.-J., Carrero, I., Ogier-Denis, E., Laburthe, M.: Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNS encoding proteins with different N-terminal domains. Biochem. Biopys. Res. Commun. 200:769-776, 1994.

2. Hashimoto, H., Nishino, A., Shintani, N., Hagihara, N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Yamamoto, K., Matsuda, T., Ishihara, T., Nagata, S., Baba, A.: Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal

PATRICIA [illegible] MORENO

970

polypeptide 1 (VPAC-1) receptor. Genomics 58:90-93, 1999.

3. Libert, F., Passage, E., Parmentier, M., Simons, M.-J., Vassart, G., Mattei, M.-G., Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonine receptor. Genomics 11: 225-227, 1991.

4. Sreedharan, S.P., Huang, J.-X., Cheung, M.-C., Goetzl, E.J.: Structure, expression and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. Proc. Nat. Acad. Sci. 92:2939-2943, 1995.

5. Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Huang, J.-X., Goetzl, E.J.: Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193:546-553, 1993.

6. Sreedharan, S.P., Robichon, A., Peterson, K.E., Goetzl, E.J.: Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. 88:4986-4990, 1991.

7. Vassart, G.: Personal Communication. Bruselas, Bélgica, 1-15-1992.

PATRICIA KOCH MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
113
MADRID

8. Wenger, G.D.: Personal Communication, Columbus, Ohio, 8-3-1993.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VPAC2

1. Adamou, J.E., Aiyar, N., Van Horn, S., Elshourbagy, N.A.: Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 209:385-392, 1995.

2. MacKay, M., Fantes, J., Scherer, S., Boyle, S., West, K., Tsui, L.-C., Belloni, E., Lutz, E., Van Heyningen, V., Harmar, A.J.: Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. Genomics 37:345-353, 1996.

3. Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., Goosens, J.-F., De Neef, P., Waelbroeck, M. Robberecht, P.: Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochem. Biophy. Res. Commun. 205:1617-1624, 1994.

MORENO
MADRID
Telé.

972

## LISTADO DE SECUENCIAS

1. NEP (EC 3.4.24.11)

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSMRNAEN 3181 pb mRNA PRI 12-sep-1993 |
| DEFINICION | mRNA humano para encefalinasa (EC 3.4.24.11) |
| ACCESO | X07166 |
| NID | g34757 |
| VERSION | X07166.1 GI: 34757 |
| PALABRAS CLAVE | encefalinasa, metaloproteína, endopeptidasa neutra |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 3181) |
| AUTORES | Malfroy, B., Kuang, W.J., Seeburg, P.H., Mason, A.J. y Schofield, P.R. |
| TITULO | Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). |
| REVISTA | FEBS. Lett. 229 (1), 206-210 (1998) |
| MEDLINE | 88152222 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |

PATRICIA KOCH MORENO
... 113
... MADRID
Teléf. ...

973

```
source          1...3181
                /organism="Homo sapiens"
                /db_xref="taxon:9606"
                /tissue_type="placenta"
                /clone_lib="lambda gt10"
                /clone="lambda H7"
CDS             16..2249
                /note="enkephalinase (AA 1-743)"
                /codon_start=1
                /protein_id="CAA30157.1"
                /db_xref="PID:g34758"
                /db_xref="GI:34758"
                /db_xref="SWISS-PROT:P08473"
                /translation="MDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYAT
                YDDGICKSSDCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKYACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDI
                LRDELEVVLKDVLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINESAIDSRGGEPLLKLLPDIYGW
                PVATENWEQKYGASWTAEKAIAQLNSKYGKKVLINLFVGTDDKNSVNHVIHIDQPRLG
                LPSRDYYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDENQLALEMNKVMELEKEI
                ANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSLEINGKPFSWLNFTNEIMSTVNISITNE
                EDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTYKESRNAFRKALY
                GTTSETATWRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDD
                LTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNKLNNEYLELNYKEDEYFENIIQNL
                KFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSL
                NYGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSASNFKEQSQCMVYQYGNFSW
                DLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLGQAYRAYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQLFFLN
                FAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEKKC
                RVW"

misc_feature    3073..3078
                /note="poly A signal"
RECUENTO DE BASES  1055 a, 582 c, 657 g, 887 t
ORIGEN

        1 gcaagtcaga aagtcagatg gatataactg atatcaacac tccaaagcca aagaagaaac
       61 agcgatggac tccactggag atcagcctct cggtccttgt cctgctcctc accatcatag
      121 ctgtgacaat gatcgcactc tatgcaacct acgatgatgg tatttgcaag tcatcagact
      181 gcataaaatc agctgctcga ctgatccaaa acatggatgc caccactgag ccttgtacag
```

PATENTES ... MORENO
ING ... Y ... LEMAN
C ... 13
... MADRID
Teléf. ...

```
 241 acttttcaa atatgcttgc ggaggctggt tgaaacgtaa tgtcattccc gagaccagct
 301 cccgttaogg caactttgac attttaagag atgaactaga agtcgttttg aaagatgtcc
 361 ttcaagaacc caaaactgaa gatatagtag cagtgcagaa agcaaaagca ttgtacaggt
 421 cttgtataaa tgaatctgct attgatagca gaggtggaga acctctactc aaactgttac
 481 cagacatata tgggtggcca gtagcaacag aaaactggga gcaaaaatat ggtgcttctt
 541 ggacagctga aaaagctatt gcacaactga attctaaata tgggaaaaaa gtccttatta
 601 atttgtttgt tggcactgat gataagaatt ctgtgaatca tgtaattcat attgaccaac
 661 ctcgacttgg cctcccttct agagattact atgaatgcac tggaatctat aaagaggctt
 721 gtacagcata tgtggatttt atgatttctg tggccagatt gattcgtcag gaagaaagat
 781 tgcccatcga tgaaaaccag cttgctttgg aaatgaataa agttatggaa ttggaaaaag
 841 aaattgccaa tgctacggct aaacctgaag atcgaaatga tccaatgctt ctgtataaca
 901 agatgacatt ggcccagatc caaaataact tttcactaga gatcaatggg aagccattca
 961 gctggttgaa tttcacaaat gaaatcatgt caactgtgaa tattagtatt acaaatgagg
1021 aagatgtggt tgtttatgct ccagaatatt taaccaaact taagcccatt cttaccaaat
1081 attctgccag agatcttcaa aatttaatgt cctggagatt cataatggat cttgtaagca
1141 gcctcagccg aacctacaag gagtccagaa atgctttccg caaggccctt tatggtacaa
1201 cctcagaaac agcaacttgg agacgttgtg caaactatgt caatgggaat atggaaaatg
1261 ctgtggggag gctttatgtg gaagcagcat ttgctggaga gagtaaacat gtggtcgagg
1321 atttgattgc acagatccga gaagttttta ttcagacttt agatgacctc acttggatgg
1381 atgccgagac aaaaaagaga gctgaagaaa aggccttagc aattaaagaa aggatcggct
1441 atcctgatga cattgtttca aatgataaca aactgaataa tgagtacctc gagttgaact
1501 acaaagaaga tgaatacttc gagaacataa ttcaaaattt gaaattcagc caaagtaaac
1561 aactgaagaa gctccgagaa aaggtggaca aagatgagtg gataagtgga gcagctgtag
1621 tcaatgcatt ttactcttca ggaagaaatc agatagtctt cccagccggc attctgcagc
1681 ccccttctt tagtgcccag cagtccaact cattgaacta tgggggcatc ggcatggtca
1741 taggacacga aatcacccat ggcttcgatg acaatggcag aaactttaac aaagatggag
1801 acctcgttga ctggtggact caacagtctg caagtaactt taaggagcaa tcccagtgca
1861 tggtgtatca gtatggaaac ttttcctggg acctggcagg tggacagcac cttaatggaa
1921 ttaatacact gggagaaaac attgctgata atggaggtct tggtcaagca tacagagcct
1981 atcagaatta tattaaaaag aatggcgaag aaaaattact tcctggactt gacctaaatc
2041 acaaacaact atttttcttg aactttgcac aggtgtggtg tggaacctat aggccagagt
2101 atgcggttaa ctccattaaa acagatgtgc acagtccagg caatttcagg attattggga
2161 ctttgcagaa ctctgcagag ttttcagaag cctttcactg ccgcaagaat tcatacatga
2221 atccagaaaa gaagtgccgg gtttggtgat cttcaaaaga agcattgcag cccttggcta
2281 gacttgccaa caccacagaa atggggaatt ctctaatcga aagaaaatgg gccctagggg
2341 tcactgtact gacttgaggg tgattaacag agagggcacc atcacaatac agataacatt
2401 aggttgtcct agaaagggtg tggagggagg aagggggtct aaggtctatc aagtcaatca
2461 tttctcactg tgtacataat gcttaatttc taaagataat attactgttt atttctgttt
2521 ctcatatggt ctaccagttt gctgatgtcc ctagaaaaca atgcaaaacc tttgaggtag
2581 accaggattt ctaatcaaaa gggaaaagaa gatgttgaag aatacagtta ggcaccagaa
2641 gaacagtagg tgacactata gtttaaaaca cattgcctaa ctactagttt ttacttttat
2701 ttgcaacatt tacagtcctt caaaatcctt ccaaagaatt cttatacaca ttggggcctt
2761 ggagcttaca tagttttaaa ctcatttttg ccatacatca gttattcatt ctgtgatcat
2821 ttattttaag cactcttaaa gcaaaaaatg aatgtctaaa attgtttttt gttgtacctg
2881 ctttgactga tgctgagatt cttcaggctt cctgcaattt tctaagcaat ttcttgctct
2941 atctctcaaa acttggtatt tttcagagat ttatataaat gtaaaaataa taattttat
3001 atttaattat taactacatt tatgagtaac tattattata ggtaatcaat gaatattgaa
3061 gtttcagctt aaaataaaca gttgtgaacc aagatctata aagcgatata cagatgaaaa
3121 tttgagacta tttaaactta taaatcatat tgatgaaaag atttaagcac aaactttagg
3181 g
```

975

MORENO
MADRID
Teléf.

**2. PDE de tipo 1**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSPDE1A3A 2008 pb mRNA PRI 12-abr-1996 |
| DEFINICION | mRNA de fosfodiesterasa de nucleótidos 3',5'-cíclicos humana (HSPDE1A3A), cd completo. |
| ACCESO | U40370 |
| NID | g1151108 |
| VERSION | U40370.1 GI: 1151108 |
| PALABRAS CLAVE | fosfodiesterasa estimulada por calmodulina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 2008) |
| AUTORES | Loughney, K., Martins., T.J., Harris, E.A., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., y Ferguson, K. |
| TITULO | Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterases |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 271 (2), 796-806 (1996) |
| MEDLINE | 96132810 |

PATENTES ... MORENO
... MADRID
Telé...

| | |
|---|---|
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 2008) |
| AUTORES | Loughney, K., Martins., T.J., Harris, E.A.S., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., y Ferguson, K. |
| TITULO | Envío directo |
| REVISTA | Enviado el 7 de noviembre de 1995. Kate Loughney, ICOS, 22021 20th Ave. S.E., Bothell, WA 98021, EE.UU. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1...2008 |

```
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            85..1692
                     /gene="PDE1A"
     CDS             85..1692
                     /gene="PDE1A"
                     /note="PDE1A3; type I phosphodiesterase"
                     /codon_start=1
                     /product="3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase"
                     /protein_id="AAC50436.1"
                     /db_xref="PID:g1151109"
                     /db_xref="GI:1151109"
                     /translation="MGSSATEIEELENTTFKYLTGEQTEKMWQRLKGILRCLVKQLER
                     GDVNVVDLKKNIEYAASVLEAVYIDETRRLLDTEDELSDIQTDSVPSEVRDWLASTFT
                     RKMGMTKKKPEEKPKFRSIVHAVQAGIFVERMYRKTYHMVGLAYPAAVIVTLKDVDKW
                     SFDVFALNEASGEHSLKFMIYELFTRYDLINRFKIPVSCLITFAEALEVGYSKYKNPY
                     HNLIHAADVTQTVHYIMLHTGIMHWLTELEILAMVFAAAIHDYEHTGTTNNFHIQTRS
                     DVAILYNDRSVLENHHVSAAYRLMQEEEMNILINLSKDDWRDLRNLVIEMVLSTDMSG
                     HFQQIKNIRNSLQQPEGIDRAKTMSLILHAADISHPAKSWKLHYRWTMALMEEFFLQG
                     DKEAELGLPFSPLCDRKSTMVAQSQIGFIDFIVEPTFSLLTDSTEKIVIPLIEEASKA
                     ETSSYVASSSTTIVGLHIADALRRSNTKGSMSDGSYSPDYSLAAVDLKSFKNNLVDII
                     QQNKERWKELAAQEARTSSQKCEFIHQ"
```

RECUENTO DE BASES 627 a, 400 c, 437 g, 544 t

PATRICIA ROCH MORENO
ING... MAN
...313
...RID
Telf...

ORIGEN

```
   1 gaattctgat gtgcttcagt gcacagaaca gtaacagatg agctgctttt ggggagagct
  61 tgagtactca gtcggagcat catcatgggg tctagtgcca cagagattga agaattggaa
 121 aacaccactt ttaagtatct tacaggagaa cagactgaaa aaatgtggca gcgcctgaaa
 181 ggaatactaa gatgcttggt gaagcagctg gaaagaggtg atgttaacgt cgtcgactta
 241 aagaagaata ttgaatatgc ggcatctgtg ctggaagcag tttatatcga tgaaacaaga
 301 agacttctgg atactgaaga tgagctcagt gacattcaga ctgactcagt cccatctgaa
 361 gtccgggact ggttggcttc tacctttaca cggaaaatgg ggatgacaaa aaagaaacct
 421 gaggaaaaac caaaatttcg gagcattgtg catgctgttc aagctggaat ttttgtggaa
 481 agaatgtacc gaaaaacata tcatatggtt ggtttggcat atccagcagc tgtcatcgta
 541 acattaaagg atgttgataa atggtctttc gatgtatttg ccctaaatga agcaagtgga
 601 gagcatagtc tgaagtttat gatttatgaa ctgtttacca gatatgatct tatcaaccgt

 661 ttcaagattc ctgtttcttg cctaatcacc tttgcagaag ctttagaagt tggttacagc
 721 aagtacaaaa atccatatca caatttgatt catgcagctg atgtcactca aactgtgcat
 781 tacataatgc ttcatacagg tatcatgcac tggctcactg aactggaaat tttagcaatg
 841 gtctttgctg ctgccattca tgattatgag catacaggga caacaaacaa ctttcacatt
 901 cagacaaggt cagatgttgc cattttgtat aatgatcgct ctgtccttga gaatcaccac
 961 gtgagtgcag cttatcgact tatgcaagaa gaagaaatga atatcttgat aaatttatcc
1021 aaagatgact ggagggatct tcggaaccta gtgattgaaa tggttttatc tacagacatg
1081 tcaggtcact tccagcaaat taaaaatata agaaacagtt tgcagcagcc tgaagggatt
1141 gacagagcca aaaccatgtc cctgattctc cacgcagcag acatcagcca cccagccaaa
1201 tcctggaagc tgcattatcg gtggaccatg gccctaatgg aggagttttt cctgcaggga
1261 gataaagaag ctgaattagg gcttccattt tccccacttt gtgatcggaa gtcaaccatg
1321 gtggcccagt cacaaatagg tttcatcgat ttcatagtag agccaacatt ttctcttctg
1381 acagactcaa cagagaaaat tgttattcct cttatagagg aagcctcaaa agccgaaact
1441 tcttcctatg tggcaagcag ctcaaccacc attgtggggt tacacattgc tgatgcacta
1501 agacgatcaa atacaaaagg ctccatgagt gatgggtcct attccccaga ctactcccct
1561 gcagcagtgg acctgaagag tttcaagaac aacctggtgg acatcattca gcagaacaaa
1621 gagaggtgga aagagttagc tgcacaagaa gcaagaacca gttcacagaa gtgtgagttt
1681 attcatcagt aaacaccttt aagtaaaacc tcgtgcatgg tggcagctct aatttgacca
1741 aaagacttgg agattttgat tatgcttgct ggaaatctac cctgtcctgt gtgagacagg
1801 aaatctattt ttgcagattg ctcaataagc atcatgagcc acataaataa cagctgtaaa
1861 ctccttaatt caccgggctc aactgctacc gaacagattc atctagtggc tacatcagca
1921 ccttgtgctt tcagatatct gtttcaatgg cattttgtgg catttgtctt taccgagtgc
1981 caataaattt tctttgagca aaaaaaaa
```

**2. PDE de tipo 2**

LOCUS HSU67733 4240 pb mRNA PRI 21-may-1997

DEFINICION mRNA de fosfodiesterasa de nucleótidos

PATENTES
ING.
MADRID
Telf.

| | |
|---|---|
| | 3',5'-cíclicos humana estimulada por cGMP PDE2A3 (PDE2A), cd completo. |
| ACCESO | U67733 |
| NID | g2108051 |
| VERSION | U67733.1 GI: 2108051 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 4240) |
| AUTORES | Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K. and Loughley, K. |
| TITULO | Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterase |
| REVISTA | Gene 191 (1), 89-95 (1997) |
| MEDLINE | 97354299 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 4240) |
| AUTORES | Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K. and Loughley, K. |
| TITULO | Envío directo |

PATENTIA ... INGLES Y ... MADRID
Telé...

REVISTA Enviado el 21 de agosto de 1996. ICOS Corporation, 22021 20th Ave. S.E., Bothell, WA 98021, EE.UU.

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores
source 1...4240
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
gene 162..2987
/gene="PDE2A"
CDS 162..2987
/gene="PDE2A"
/function="cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase"
/note="PDE2 family; splice variant 3"
/codon_start=1
/product="PDE2A3"
/protein_id="AAC51320.1"
/db_xref="PID:g2108052"
/db_xref="GI:2108052"
/translation="MGQACGHSILCRSQQYPAARPAEPRGQQVFLKPDEPPPPPQPCA
DSLQDALLSLGSVIDISGLQRAVKEALSAVLPRVETVYTYLLDGESQLVCEDPPHELP
QEGKVREAIISQKRLGCNGLGFSDLPGKPLARLVAPLAPDTQVLVMPLADKEAGAVAA
VILVHCGQLSDNEEWSLQAVEKHTLVALRRVQVLQQRGPREAPRAVQNPPEGTAEDQK
GGAAYTDRDRKILQLCGELYDLDASSLQLKVLQYLQQETRASRCCLLLVSEDNLQLSC
KVIGDKVLGEEVSFPLTGCLGQVVEDKKSIQLKDLTSEDVQQLQSMLGCELQAMLCVP
VISRATDQVVALACAFNKLEGDLFTDEDEHVIQHCFHYTSTVLTSTLAFQKEQKLKCE
CQALLQVAKNLFTHLDDVSVLLQEIITEARNLSNAEICSVFLLDQNELVAKVFDGGVV
DDESYEIRIPADQGIAGHVATTGQILNIPDAYAHPLFYRGVDDSTGFRTRNILCFPIK
NENQEVIGVAELVNKINGPWFSKFDEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHL
ANEMMMYHMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQ
DMNFINNYKIDCPTLARFCLMVKKGYRDPPYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLE
DIEIFALFISCMCHDLDHRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSVMERHHFAQAIAILNT
HGCNIFDHFSRKDYQRMLDLMRDIILATDLAHHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHHRL
LLCLLMTSCDLSDQTKGWKTTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIP
ELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNREHWTKVSHKFTIRGLPSNNSLD
FLDEEYEVPDLDGTRAPINGCCSLDAE"

RECUENTO DE BASES 902 a, 1260 c, 1202 g, 876 t

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
INO [illegible]
RID
C [illegible]
TC.A. [illegible]

ORIGEN

```
   1 cagcagagct ggattggggt gttgagtcca ggctgagtag ggggcagccc actgctcttg
  61 gtccctgtgc ctgctggggg tgccctgccc tgaactccag gcagcgggga cagggcgagg
 121 tgccacctta gtctggctgg ggaggcggac gatgaggagt gatggggcag gcatgcggcc
 181 actccatcct ctgcaggagc cagcagtacc cggcagcgcg accggctgag ccgcggggcc
 241 agcaggtctt cctcaagccg gacgagccgc cgccgccgcc gcagccatgc gccgacagcc
 301 tgcaggacgc cttgctgagt ctgggctctg tcatcgacat ttcaggcctg caacgtgctg
 361 tcaaggaggc cctgtcagct gtgctccccc gagtggaaac tgtctacacc tacctactgg
 421 atggtgagtc ccagctggtg tgtgaggacc ccccacatga gctgccccag gaggggaaag
 481 tccgggaggc tatcatctcc cagaagcggc tgggctgcaa tgggctgggc ttctcagacc
 541 tgccagggaa gcccttggcc aggctggtgg ctccactggc tcctgatacc caagtgctgg
 601 tcatgccgct agcggacaag gaggctgggg ccgtggcagc tgtcatcttg gtgcactgtg
 661 gccagctgag tgataatgag gaatggagcc tgcaggcggt ggagaagcat accctggtcg
 721 ccctgcggag ggtgcaggtc ctgcagcagc gcgggcccag ggaggctccc cgagccgtcc
 781 agaacccccc ggaggggacg gcggaagacc agaagggcgg ggcggcgtac accgaccgcg
 841 accgcaagat cctccaactg tgcggggaac tctacgacct ggatgcctct tccctgcagc
 901 tcaaagtgct ccaatacctg cagcaggaga cccgggcatc ccgctgctgc ctcctgctgg
 961 tgtcggagga caatctccag ctttcttgca aggtcatcgg agacaaagtg ctcggggaag
1021 aggtcagctt tcccttgaca ggatgcctgg gccaggtggt ggaagacaag aagtccatcc
1081 agctgaagga cctcacctcc gaggatgtac aacagctgca gagcatgttg ggctgtgagc
1141 tgcaggccat gctctgtgtc cctgtcatca gccgggccac tgaccaggtg gtggccttgg
1201 cctgcgcctt caacaagcta gaaggagact tgttcaccga cgaggacgag catgtgatcc
1261 agcactgctt ccactacacc agcaccgtgc tcaccagcac cctggccttc cagaaggaac
1321 agaaactcaa gtgtgagtgc caggctcttc tccaagtggc aaagaacctc ttcacccacc
1381 tggatgacgt ctctgtcctg ctccaggaga tcatcacgga ggccagaaac ctcagcaacg
1441 cagagatctg ctctgtgttc ctgctggatc agaatgagct ggtggccaag gtgttcgacg
1501 ggggcgtggt ggatgatgag agctatgaga tccgcatccc ggccgatcag ggcatcgcgg
1561 gacacgtggc gaccacgggc cagatcctga acatccctga cgcatatgcc catccgcttt
1621 tctaccgcgg cgtggacgac agcaccggct tccgcacgcg caacatcctc tgcttcccca
```

PATENTA[illegible] MORENO
ING. [illegible] L. MAN
[illegible] 13
[illegible] MADRID
Telé[illegible]

1681 tcaagaacga gaaccaggag gtcatcggtg tggccgagct ggtgaacaag atcaatgggc
1741 catggttcag caagttcgac gaggacctgg cgacggcctt ctccatctac tgcggcatca
1801 gcatcgccca ttctctccta tacaaaaaag tgaatgaggc tcagtatcgc agccacctgg
1861 ccaatgagat gatgatgtac cacatgaagg tctccgacga tgagtatacc aaacttctcc
1921 atgatgggat ccagcctgtg gctgccattg actccaattt tgcaagtttc acctataccc
1981 ctcgttccct gcccgaggat gacacgtcca tggccatcct gagcatgctg caggacatga
2041 atttcatcaa caactacaaa attgactgcc cgaccctggc ccggttctgt ttgatggtga
2101 agaagggcta ccgggatccc ccctaccaca actggatgca cgccttttct gtctcccact
2161 tctgctacct gctctacaag aacctggagc tcaccaacta cctcgaggac atcgagatct
2221 ttgccttgtt tatttcctgc atgtgtcatg acctggacca cagaggcaca aacaactctt
2281 tccaggtggc ctcgaaatct gtgctggctg cgctctacag ctctgagggc tccgtcatgg
2341 agaggcacca ctttgctcag gccatcgcca tcctcaacac ccacggctgc aacatctttg
2401 atcatttctc ccggaaggac tatcagcgca tgctggatct gatgcgggac atcatcttgg
2461 ccacagacct ggcccaccat ctccgcatct tcaaggacct ccagaagatg gctgaggtgg
2521 gctacgaccg aaacaacaag cagcaccaca gacttctcct ctgcctcctc atgacctcct
2581 gtgacctctc tgaccagacc aagggctgga agactacgag aaagatcgcg gagctgatct
2641 acaaagaatt cttctcccag ggagacctgg agaaggccat gggcaacagg ccgatggaga
2701 tgatggaccg ggagaaggcc tatatccctg agctgcaaat cagcttcatg gagcacattg
2761 caatgcccat ctacaagctg ttgcaggacc tgttccccaa agcggcagag ctgtacgagc
2821 gcgtggcctc caaccgtgag cactggacca aggtgtccca caagttcacc atccgcggcc
2881 tcccaagtaa caactcgctg gacttcctgg atgaggagta cgaggtgcct gatctggatg
2941 gcactagggc ccccatcaat ggctgctgca gccttgatgc tgagtgatcc cctccaggac
3001 acttccctgc ccaggccacc tcccacagcc ctccactggt ctggccagat gcactgggaa
3061 cagagccacg ggtcctgggt cctagaccag gacttcctgt gtgaccctgg acaagtacta
3121 ccttcctggg cctcagcttt ctcgtctgta taatggaagc aagacttcca acctcacgga
3181 gactttgtaa tttgcttctc tgagagcaca ggggtgacca atgagcagtg ggccctactc
3241 tgcacctctg accacacctt ggcaagtctt tcccaagcca ttctttgtct gagcagcttg
3301 atggtttctc cttgccccat ttctgcccca ccagatcttt gctcctttcc ctttgaggac
3361 tcccaccctt tgggtctcca ggatcctcat ggaaggggaa ggtgagacat ctgagtgagc
3421 agagtgtggc atcttggaaa cagtccttag ttctgtggga ggactagaaa cagccgcggc
3481 gaaggccccc tgaggaccac tactatactg atggtgggat tgggacctgg gggatacagg
3541 ggcccccagga agaagctggc cagaggggca gctcagtgct ctgcagagag ggccctggg
3601 gagaagcagg atgggattga tgggcaggag ggatccccgc actgggagac aggcccaggt
3661 atgaatgagc cagccatgct tcctcctgcc tgtgtgacgc tgggcgagtc tcttcccctg
3721 tctgggccaa acagggagcg ggtaagacaa tccatgctct aagatccatt ttagatcaat
3781 gtctaaaata gctctatggc tctgcggagt cccagcagag gctatggaat gtttctgcaa
3841 ccctaaggca cagagagcca accctgagtg tctcagaggc cccctgagtg ttccccttgg
3901 cctgagcccc ttacccattc ctgcagccag tgagagacct ggcctcagcc tggcagcgct
3961 ctcttcaagg ccatatccac ctgtgccctg gggcttggga gaccccatag gccgggactc
4021 ttgggtcagc ccgccactgg cttctctctt tttctccgtt tcattctgtg tgcgttgtgg
4081 ggtgggggag gggtccacc tgccttacct ttctgagttg cctttagaga gatgcgtttt
4141 tctaggactc tgtgcaactg tcgtatatgg tcccgtgggc tgaccgcttt gtacatgaga
4201 ataaatctat ttctttctac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
113
ADRID
Tel.

**4. NPY**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HUMNPY 551 pb mRNA PRI 7-ene-1995 |
| DEFINICION | mRNA de neuropéptido Y humano (NPY), cd completo. |
| ACCESO | K01911 |
| NID | g189273 |
| VERSION | K01911.1 GI:189273 |
| PALABRAS CLAVE | neuropéptido Y |
| FUENTE | feocromocitoma humano, cDNA a mRNA, clon pNPY3-75 |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 551) |
| AUTORES | Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M. y Dixon, J.E. |
| TITULO | Cloning, characterization and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine |
| REVISTA | Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (14), 4577-4581 (1984) |
| MEDLINE | 84272678 |
| COMENTARIO | El neuropéptido Y (NPY) es uno de los péptidos más abundantes en el sistema |

PATRICIA KOCH MORENO
INGLS Y ALEMAN
c. ... 113
Tel. ... MADRID

nervioso mamífero, y su extensa distribución sugiere un papel neurotransmisor o modulador. También se encuentra en algunas células de cromafina de la médula suprarrenal.

```
CARACTERISTICAS          Localización/Cualificadores
source              1...551
                    /organism="Homo sapiens"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /tissue_type="pheochromocytoma"
                    /map="7pter-q22"
  mRNA              <1..551
                    /gene="NPY"
                    /note="G00-119-456"
  gene              1..551
                    /gene="NPY"
  sig_peptide       87..170
                    /gene="NPY"
                    /note="G00-119-456"
  CDS               87..380.
                    /gene="NPY"
                    /codon_start=1
                    /db_xref="GDB:G00-119-456"
                    /product="neuropeptide Y"
                    /protein_id="AAA59944.1"
                    /db_xref="PID:g189274"
                    /db_xref="GI:189274"
                    /translation="MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAED
                    MARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRLEDPAMW"
  mat_peptide       171..278
                    /gene="NPY"
                    /note="G00-119-456"
                    /product="neuropeptide Y"
```

RECUENTO DE BASES 131 a, 171 c, 129 g, 120 t

PATRICIA ... MORENO
... Y ... AN
... 13
... RID
Telf. ...

ORIGEN 51 pb cadena arriba de un sitio RsaI

```
  1 accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc
 61 ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgactgggg ctgtccggac
121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgaggcg taccccctcca
181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
301 cactgatttc agacctcttg atgagagaaa gcacagaaaa tgttcccaga actcggcttg
361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
421 gcccatattt catcgtgtaa aacgagaatc cacccatcct accaatgcat gcagccactg
481 tgctgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
541 atcatgcatt c
```

## 5. Receptor de NPY Y1

LOCUS A26481 2624 pb mRNA PAT 17-oct-1995

DEFINICION cDNA del gen del receptor Y1 de NPY humano.

ACCESO A26481

NID g1247452

VERSION A26481.1 GI:1247452

PALABRAS CLAVE -

FUENTE humana

ORGANISMO Homo sapiens
Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata,
Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini,
Hominidae, Homo.

REFERENCIA 1 (bases 1 a 2624)

AUTORES -

TITULO HUMAN NEUROPEPTIDE Y-Y1 RECEPTOR

REVISTA Patente: WO 9309227-A 3 13 de mayo de 1993)

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teló. [illegible]

```
     source          1..2624
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     CDS             152..1306
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y Y1 receptor"
                     /protein_id="CAA01819.1"
                     /db_xref="PID:e205126"
                     /db_xref="PID:g1247453"
                     /db_xref="GI:1247453"
                     /db_xref="SWISS-PROT:P25929"
                     /translation="MNSTLFSQVENHSVHSNFSEKNAQLLAFENDDCHLPLAMIFTLA
                     LAYGAVIILGVSGNLALIIIILKQKEMRNVTNILIVNLSFSDLLVAIMCLPFTFVYTL
                     MDHWVFGEAMCKLNPFVQCVSITVSIFSLVLIAVERHQLIINPRGWRPNNRHAYVGIA
                     VIWVLAVASSLPFLIYQVMTDEPFQNVTLDAYKDKYVCFDQFPSDSHRLSYTTLLLVL
                     QYFGPLCFIFICYFKIYIRLKRRNNMMDKMRDNKYRSSETKRINIMLLSIVVAFAVCW
                     LPLTIFNTVFDWNHQIIATCNHNLLFLLCHLTAMISTCVNPIFYGFLNKNFQRDLQFF
                     FNFCDFRSRDDDYETIAMSTMHTDVSKTSLKQASPVAFKKINNNDDNEKI"
```

RECUENTO DE BASES 791 a, 479 c, 473 g, 878 t, 3 otras

ORIGEN

PATRICIA ... MORENO
ING ... MAN
... 113
... MADRID
Tel...

```
   1 attgttcagt tcaagggaat gaagaattca gaataatttt ggtaaatgga ttccaatatc
  61 gggaataaga ataagctgaa cagttgacct gctttgaaga aacatactgt ccatttgtct
 121 aaaataatct ataacaacca aaccaatcaa aatgaattca acattatttt cccaggttga
 181 aaatcattca gtccactcta atttctcaga gaagaatgcc cagcttctgg cttttgaaaa
 241 tgatgattgt catctgccct tggccatgat atttacctta gctcttgctt atggagctgt
 301 gatcattctt ggtgtctctg gaaacctggc cttgatcata atcatcttga aacaaaagga
 361 gatgagaaat gttaccaaca tcctgattgt gaacctttcc ttctcagact tgcttgttgc
 421 catcatgtgt ctcccccttta catttgtcta cacattaatg gaccactggg tctttggtga
 481 ggcgatgtgt aagttgaatc cttttgtgca atgtgtttca atcactgtgt ccatttctc
 541 tctggttctc attgctgtgg aacgacatca gctgataatc aaccctcgag ggtggagacc
 601 aaataataga catgcttatg taggtattgc tgtgatttgg gtccttgctg tggcttcttc
 661 tttgcctttc ctgatctacc aagtaatgac tgatgagccg ttccaaaatg taacacttga
 721 tgcgtacaaa gacaaatacg tgtgctttga tcaatttcca tcggactctc ataggttgtc
 781 ttataccact ctcctcttgg tgctgcagta ttttggtcca ctttgtttta tatttatttg
 841 ctacttcaag atatatatac gcctaaaaag gagaaacaac atgatggaca agatgagaga
 901 caataagtac aggtccagtg aaaccaaaag aatcaatatc atgctgctct ccattgtggt
 961 agcatttgca gtctgctggc tccctcttac catctttaac actgtgtttg attggaatca
1021 tcagatcatt gctacctgca accacaatct gttattcctg ctctgccacc tcacagcaat
1081 gatatccact tgtgtcaacc ccatatttta tgggttcctg aacaaaaact tccagagaga
1141 cttgcagttc ttcttcaact tttgtgattt ccggtctcgg gatgatgatt atgaaacaat
1201 agccatgtcc acgatgcaca cagatgtttc caaaacttct ttgaagcaag caagcccagt
1261 cgcatttaaa aaaatcaaca acaatgatga taatgaaaaa atctgaaact acttatagcc
1321 tatggtcccg gatgacatct gtttaaaaac aagcacaacc tgcaacatac tttgattacc
1381 tgttctccca aggaatgggg ttgaaatcat ttgaaaatga ctaagatttt cttgtcttgc

1441 tttttactg cttttgttgt agtgtcataa ttacatttgg aacaaaaggt gtgggctttg
1501 gggtcttctg gaaatagttt tgaccagaca tctttgaagt gctttttgtg aatttatgca
1561 tataatataa agacttttat actgtactta ttggaatgaa atttctttaa agtattacga
1621 tnnnctgact tcagaagtac ctgccatcca atacggtcat tagattgggt catcttgatt
1681 agattagatt agattagatt gtcaacagat tgggccatcc ttactttatg ataggcatca
1741 ttttagtgtg ttacaatagt aacagtatgc aaaagcagca ttcaggagcc gaaagatagt
1801 cttgaagtca ttcagaagtg gtttgaggtt tctgtttttt ggtggttttt gtttgttttt
1861 ttttttttc accttaaggg aggctttcat ttcctcccga ctgattgtca cttaaatcaa
1921 aatttaaaaa tgaataaaaa gacatacttc tcagctgcaa atattatgga gaattgggca
1981 cccacaggaa tgaagagaga aagcagctcc ccaacttcaa aaccattttg gtacctgaca
2041 acaagagcat tttagagtaa ttaatttaat aaagtaaatt agtattgctg caaatagcta
2101 aattatattt atttgaattg atggtcaaga gattttccat ttttttaca gactgttcag
2161 tgtttgtcaa gcttctggtc taatatgtac tcgaaagact ttccgcttac aatttgtaga
2221 aacacaaata tcgttttcca tacagcagtg cctatatagt gactgatttt aactttcaat
2281 gtccatcttt caaaggaagt aacaccaagg tacaatgtta aaggaatatt cactttacct
2341 agcagggaaa aatacacaaa aactgcagat acttcatata gcccatttta acttgtataa
2401 actgtgtgac ttgtggcgtc ttataaataa tgcactgtaa agattactga atagttgtgt
2461 catgttaatg tgcctaattt catgtatctt gtaatcatga ttgagcctca gaatcatttg
2521 gagaaactat attttaaaga acaagacata cttcaatgta ttatacagat aaagtattac
2581 atgtgtttga ttttaaaagg gcggacattt tattaaaatc aagg
```

PATRICIA KOSS MORENO
INGLES Y [illegible] MAN
C. [illegible] 113
Tele. [illegible] MADRID

### 6. Receptor de NPY Y2

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSU36269 1200 pb mRNA PRI 14-nov-1995 |
| DEFINICION | mRNA del receptor Y2 de neuropéptido Y/péptido YY humano, cd completo. |
| ACCESO | U36269 |
| NID | g1063633 |
| VERSION | U36269.1 GI:1063633 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1200) |
| AUTORES | Gerald, C., Walker, M.W., Vayssem P.J., He, C., Brancheck, T.A. y Weinshank, R.L. |
| TITULO | Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 270 (45), 26758-26761 (1995) |
| MEDLINE | 96070760 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 1200) |
| AUTORES | Gerald, C.A. |

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS [illegible]
C [illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

TITULO Envío directo

REVISTA Enviada el 13 de septiembre de 1995. Christophe A. Gerald, Synaptic Pharmaceutical Corporation, Molecular Biology, 215 College Road, Paramus, NJ 07652, EE.UU.

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

source 1..1200

/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/clone="hhY2"
/sex="male"
/tissue_type="brain hippocampus"
/dev_stage="adult"

5'UTR 1..20

PATRICIA HIGH MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
C. ... 113
... MADRID
Teléf. ...

989

```
     CDS             21..1166
                     /note="NPY/PYY Y2 receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor"
                     /protein_id="AAC50281.1"
                     /db_xref="PID:g1063634"
                     /db_xref="GI:1063634"
                     /translation="MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGPQTTPRGELVPDPEPELIDST
                     KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTL
                     CLPFTLTYTLMGEWKMGPVLCHLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKI
                     SKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEKSIYGTV
                     YSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAANDHYHQRRQKTTKMLVCVVVV
                     FAVSWLPLHAFQLAVDIDSQVLDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRK
                     AFLSAFRCEQRLDAIHSEVSVTFKAKKNLEVRKNSGPNDSFTEATNV"
     3'UTR           1164..1200
```

RECUENTO DE BASES 292 a, 295 c, 299 g, 314 t

ORIGEN

```
        1 caagtggacc tgtactgaaa atgggtccaa taggtgcaga ggctgatgag aaccagacag
       61 tggaagaaat gaaggtggaa caatacgggc cacaaacaac tcctagaggt gaactggtcc
      121 ctgaccctga gccagagctt atagatagta ccaagctgat tgaggtacaa gttgttctca
      181 tattggccta ctgctccatc atcttgcttg ggtaattgg caactccttg gtgatccatg
      241 tggtgatcaa attcaagagc atgcgcacag taaccaactt tttcattgcc aatctggctg
      301 tggcagatct tttggtgaac actctgtgtc taccgttcac tcttacctat accttaatgg
      361 gggagtggaa aatgggtcct gtcctgtgcc acctggtgcc ctatgcccag ggcctggcag
      421 tacaagtatc cacaatcacc ttgacagtaa ttgccctgga ccggcacagg tgcatcgtct
      481 accacctaga gagcaagatc tccaagcgaa tcagcttcct gattattggc ttggcctggg
      541 gcatcagtgc cctgctggca agtcccctgg ccatcttccg ggagtattcg ctgattgaga
      601 tcatcccgga ctttgagatt gtggcctgta ctgaaaagtg gcctggcgag gagaagagca
      661 tctatggcac tgtctatagt ctttcttcct tgttgatctt gtatgttttg cctctgggca
      721 ttatatcatt ttcctacact cgcatttgga gtaaattgaa gaaccatgtc agtcctggag
      781 ctgcaaatga ccactaccat cagcgaaggc aaaaaaccac caaaatgctg gtgtgtgtgg
      841 tggtggtgtt tgcggtcagc tggctgcctc tccatgcctt ccagcttgcc gttgacattg
      901 acagccaggt cctggacctg aaggagtaca aactcatctt cacagtgttc cacatcatcg
      961 ccatgtgctc cacttttgcc aatccccttc tctatggctg gatgaacagc aactacagaa
     1021 aggctttcct ctcggccttc cgctgtgagc agcggttgga tgccattcac tctgaggtgt
     1081 ccgtgacatt caaggctaaa aagaacctgg aggtcagaaa gaacagtggc cccaatgact
     1141 ctttcacaga ggctaccaat gtctaaggaa gctgtggtgt gaaaatgtat ggatgaattc
```

5 7. Receptor de NPY Y5

PATENTES ... MORENO
ING. ... MAN
... 113
... MADRID
Teléf. ...

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSU66275 1370 pb mRNA PRI 18-oct-1996 |
| DEFINICION | mRNA del receptor Y5 de neuropéptido humano (NPYR5), cd completo. |
| ACCESO | U66275 |
| NID | g1620655 |
| VERSION | U66275.1 GI:1620655 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1370) |
| AUTORES | Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., DeCarr, L.B:, Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang., P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velázquez, N. y McCaleb, M.L. |
| TITULO | Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behaviour |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 271 (42), 26315-26319 (1996) |
| MEDLINE | 96421636 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 1370) |
| AUTORES | Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., |

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS [illegible] ALEMAN
[illegible] nº 113
[illegible] MADRID

DeCarr, L.B:, Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang., P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velázquez, N. y McCaleb, M.L.

TITULO Envío directo

REVISTA Enviada el 6 de agosto de 1996. Metabolic Disorders. Bayer Corporation, 400 Morgan Lane, West Haven, CT 06516, EE.UU.

```
CARACTERISTICAS          Localización/Cualificadores
source          1..1370
                /organism="Homo sapiens"
                /db_xref="taxon:9606"
   gene         18..1355
                /gene="NPYR5"
   CDS          18..1355
                /gene="NPYR5"
                /function="G protein-coupled receptor"
                /codon_start=1
                /product="neuropeptide Y5 receptor"
                /protein_id="AAC50741.1"
                /db_xref="PID:g1620656"
                /db_xref="GI:1620656"
                /translation="MDLELDEYYNKTLATENNTAATRNSDFPVWDDYKSSVDDLQYFL
                IGLYTFVSLLGFMGNLLILMALMKKRNQKTTVNFLIGNLAFSDILVVLFCSPFTLTSV
                LLDQWMFGKVMCHIMPFLQCVSVLVSTLILISIAIVRYHMIKHPISNNLTANHGYFLI
                ATVWTLGFAICSPLPVFHSLVELQETFGSALLSSRYLCVESWPSDSYRIAFTISLLLV
                QYILPLVCLTVSHTSVCRSISCGLSNKENRLEENEMINLTLHPSKKSGPQVKLSGSHK
                WSYSFIKKHRRRYSKKTACVLPAPERPSQENHSRILPENFGSVRSQLSSSSKFIPGVP
                TCFEIKPEENSDVHELRVKRSVTRIKKRSRSVFYRLTILILVFAVSWMPLHLFHVVTD
                FNDNLISNRHFKLVYCICHLLGMMSCCLNPILYGFLNNGIKADLVSLIHCLHM"
```

RECUENTO DE BASES 392 a, 263 c, 257 g, 458 t

ORIGEN

PATRICIA VECH MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. [illegible] nº, 113 - MADRID
Teléf. [illegible]

```
   1 ccaagcagga ctataatatg gatttagagc tcgacgagta ttataacaag acacttgcca
  61 cagagaataa tactgctgcc actcggaatt ctgatttccc agtctgggat gactataaaa
 121 gcagtgtaga tgacttacag tattttctga ttgggctcta tacatttgta agtcttcttg
 181 gctttatggg gaatctactt attttaatgg ctctcatgaa aaagcgtaat cagaagacta

 241 cggtaaactt cctcataggc aatctggcct tttctgatat cttggttgtg ctgttttgct
 301 cacctttcac actgacgtct gtcttgctgg atcagtggat gtttggcaaa gtcatgtgcc
 361 atattatgcc ttttcttcaa tgtgtgtcag ttttggtttc aactttaatt ttaatatcaa
 421 ttgccattgt caggtatcat atgataaaac atcccatatc taataattta acagcaaacc
 481 atggctactt tctgatagct actgtctgga cactaggttt tgccatctgt tctccccttc
 541 cagtgtttca cagtcttgtg gaacttcaag aaacatttgg ttcagcattg ctgagcagca
 601 ggtatttatg tgttgagtca tggccatctg attcatacag aattgccttt actatctctt
 661 tattgctagt tcagtatatt ctgcccttag tttgtcttac tgtaagtcat acaagtgtct
 721 gcagaagtat aagctgtgga ttgtccaaca aagaaaacag acttgaagaa aatgagatga
 781 tcaacttaac tcttcatcca tccaaaaaga gtgggcctca ggtgaaactc tctggcagcc
 841 ataaatggag ttattcattc atcaaaaaac acagaagaag atatagcaag aagacagcat
 901 gtgtgttacc tgctccagaa agaccttctc aagagaacca ctccagaata cttccagaaa
 961 actttggctc tgtaagaagt cagctctctt catccagtaa gttcatacca ggggtcccca
1021 cttgctttga gataaaacct gaagaaaatt cagatgttca tgaattgaga gtaaaacgtt
1081 ctgttacaag aataaaaaag agatctcgaa gtgttttcta cagactgacc atactgatat
1141 tagtatttgc tgttagttgg atgccactac accttttcca tgtggtaact gattttaatg
1201 acaatcttat ttcaaatagg catttcaagt tggtgtattg catttgtcat ttgttgggca
1261 tgatgtcctg ttgtcttaat ccaattctat atgggtttct taataatggg attaaagctg
1321 atttagtgtc ccttatacac tgtcttcata tgtaataatt ctcactgttt
```

## 8. VIP

| | |
|---|---|
| LOCUS | VIP 1511 pb mRNA PRI 19-mar-1999 |
| DEFINICION | mRNA del péptido intestinal vasoactivo (VIP) de Homo sapiens. |
| ACCESO | NM_003381 |
| NID | g4507896 |
| VERSION | NM_003381.1 GI:4507896 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |

PATRICIA [illegible] MORENO
ING. [illegible] AN
C [illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

| | |
|---|---|
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1511) |
| AUTORES | DeLamarter, J.F., Buell, G.N., Kawashima, E., Polak, J.M. y Bloom, S.R. |
| TITULO | Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in bacterial cells |
| REVISTA | Peptides 6 Supl. 1, 95-102 (1985) |
| MEDLINE | 86016352 |
| COMENTARIO | REFSEQ: Esta secuencia de referencia se derivó de M36634.<br>RefSeq PROVISIONAL: Es un registro de secuencia de referencia provisional que no ha sido sujeto todavía a revisión humana. El registro de secuencia de referencia refinado final puede ser algo diferente de este. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1511 |

PATRICIO K... MORENO
INGLES Y ALEMAN
C ... 113
... MADRID
Telef. ...

994

```
                   /organism="Homo sapiens"
                   /db_xref="taxon:9606"
                   /map="6q24-q27"
                   /tissue_type="pancreatic tumor"
gene               1..1511
                   /gene="VIP"
                   /db_xref="MIM:192320"
                   /db_xref="LocusID:7432"
sig_peptide        67..129
                   /product="vasoactive intestinal peptide"
CDS                67..579

                   /gene="VIP"
                   /codon_start=1
                   /product="vasoactive intestinal peptide"
                   /protein_id="NP_003372.1"
                   /db_xref="PID:g4507897"
                   /db_xref="GI:4507897"
                   /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                   GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                   LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                   SPDFPEELEK"
mat_peptide        307..387
                   /product="vasoactive intestinal peptide"
mat_peptide        439..522
                   /product="vasoactive intestinal peptide"
polyA_signal       1326..1331
```

RECUENTO DE BASES 541 a, 255 c, 276 g, 439 t

ORIGEN

PATENTA HOCH MORENO
INGENIEROS Y ALEMAN
C ... na, 113
MADRID
Teléf. ...

```
   1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
  61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
 121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
 181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
 241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
 301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
 361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
 421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
 481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
 541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
 601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
 661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
 721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
 781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
 841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
 901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
 961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
1081 ataaaaagac attcttccaa aaagatttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1501 aaaaaaaaaa a
```

## 9. Receptor de VPAC1

| | |
|---|---|
| LOCUS | VIP 1511 pb mRNA PRI 19-mar-1999 |
| DEFINICION | mRNA del péptido intestinal vasoactivo (VIP) de Homo sapiens. |
| ACCESO | NM_003381 |
| NID | g4507896 |
| VERSION | NM_003381.1 GI:4507896 |
| PALABRAS CLAVE | - |

PATRICIA [illegible] MORENO
ING[illegible] Y ALEMAN
C. [illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

| | |
|---|---|
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1511) |
| AUTORES | DeLamarter, J.F., Buell, G.N., Kawashima, E., Polak, J.M. y Bloom, S.R. |
| TITULO | Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in bacterial cells |
| REVISTA | Peptides 6 Supl. 1, 95-102 (1985) |
| MEDLINE | 86016352 |
| COMENTARIO | REFSEQ: Esta secuencia de referencia se derivó de M36634.<br>RefSeq PROVISIONAL: Es un registro de secuencia de referencia provisional que no ha sido sujeto todavía a revisión humana. El registro de secuencia de referencia refinado final puede ser algo diferente de este. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1511 |

PATRICIA ... MORENO
...AN
... 113
INC...
...ADRID

997

```
                    /organism="Homo sapiens"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /map="6q24-q27"
                    /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene           1..1511
                    /gene="VIP"
                    /db_xref="MIM:192320"
                    /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide    67..129
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS            67..579

                    /gene="VIP"
                    /codon_start=1
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
                    /protein_id="NP_003372.1"
                    /db_xref="PID:g4507897"
                    /db_xref="GI:4507897"
                    /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                    GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                    LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                    SPDFPEELEK"
     mat_peptide    307..387
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide    439..522
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal   1326..1331
```

RECUENTO DE BASES 541 a, 255 c, 276 g, 439 t

ORIGEN

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL[illegible]AN
C. [illegible], 113
Teléf. 519 [illegible] - MADRID

```
   1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
  61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
 121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
 181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
 241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
 301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
 361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
 421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
 481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
 541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
 601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
 661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
 721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
 781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
 841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
 901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
 961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
1081 ataaaaagac attcttccaa aaagatttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1501 aaaaaaaaaa a
```

## 10. Receptor de VPAC2

| | |
|---|---|
| LOCUS | HUMHVRP 1640 pb mRNA PRI 16-feb-1995 |
| DEFINICION | mRNA del receptor de VIP con preferencia por helodermina humano (receptor VIP2/PACAP) |
| ACCESO | L36566 |
| NID | g550477 |
| VERSION | L36566.1 GI:550477 |

PATRICIA K[illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Telél. [illegible]

999

| | |
|---|---|
| PALABRAS CLAVE | Receptor de PACAP, receptor de VIP, receptor de VIP con preferencia por helodermina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1640) |
| AUTORES | Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., J., Goosens, J.F., De Neef, P., Waelbroeck, M., y Robberecht, P. |
| TITULO | Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts |
| REVISTA | Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (3), 1617-1624 (1994) |
| MEDLINE | 95110300 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1640 |

PATENT ... MORENO
... MAN
... 13
MADRID

1000

```
                    /organism="Homo sapiens"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /cell_line="SUP T1 lymphoblast"
                    /clone_lib="lamda ZAP II"
sig_peptide         163..231
                    /note="putative; putative"
CDS                 163..1479
                    /note="human VIP2 receptor was previously called
                    'helodermin-preferring VIP receptor'; transmembrane
                    domains are located at positions: 637-696; 772-844;
                    880-948; 1003-1071; 1147-1209; 1243-1302.; Potential
                    glycosylation sites are located at :334-336; 424-426;
                    436-438."
                    /codon_start=1
                    /function="VIP and PACAP receptor"
                    /protein_id="AAC37569.1"
                    /db_xref="PID:g550478"
                    /db_xref="GI:550478"
                    /translation="MRTLLPPALLTCWLLAPVNSIHPECRFHLEIQEEETKCTELLRS
                    QTEKHKACSGVWDNITCWRPANVGETVTVPCPKVFSNFYSKAGNISKNCTSDGWSETF
                    PDFVDACGYSDPEDESKITFYILVKAIYTLGYSVSLMSLATGSIILCLFRKLHCTRNY
                    IHLNLFLSFILRAISVLVKDDVLYSSSGTLHCPDQPSSWVGCKLSLVFLQYCIMANFF


                    WLLVEGLYLHTLLVAMLPPRRCFLAYLLIGWGLPTVCIGAWTAARLYLEDTGCWDTND
                    HSVPWWVIRIPILISIIVNFVLFISIIRILLQKLTSPDVGGNDQSQYKRLAKSTLLLI
                    PLFGVHYMVFAVFPISISSKYQILFELCLGSFQGLVVAVLYCFLNSEVQCELKRKWRS
                    RCPTPSASRDYRVCGSSFSHNGSEGALQFHRASRAQSFLQTETSVI"
mat_peptide         232..1476
                    /function="VIP and PACAP receptor"
```

RECUENTO DE BASES 315 a, 512 c, 461 g, 352 t

[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

1001

ORIGEN

```
   1 cgggacgagg gggcggcccc cgcgctcggg gcgctcggct acagctgcgg ggcccgaggt
  61 ctccgcgcac tcgctcccgg cccatgctgg aggcggcgga acccggggga cctaggacgg
 121 aggcggcggg cgctgggcgg cccccggcac gctgagctcg ggatgcggac gctgctgcct
 181 cccgcgctgc tgacctgctg gctgctcgcc cccgtgaaca gcattcaccc agaatgccga
 241 tttcatctgg aaatacagga ggaagaaaca aaatgtacag agcttctgag gtctcaaaca
 301 gaaaaacaca aagcctgcag tggcgtctgg gacaacatca cgtgctggcg gcctgccaat
 361 gtgggagaga ccgtcacggt gccctgccca aaagtcttca gcaattttta cagcaaagca
 421 ggaaacataa gcaaaaactg tacgagtgac ggatggtcag agacgttccc agatttcgtc
 481 gatgcctgtg gctacagcga cccggaggat gagagcaaga tcacgtttta tattctggtg
 541 aaggccattt ataccctggg ctacagtgtc tctctgatgt ctcttgcaac aggaagcata
 601 attctgtgcc tcttcaggaa gctgcactgc accaggaatt acatccacct gaacctgttc
 661 ctgtccttca tcctgagagc catctcagtg ctggtcaagg acgacgttct ctactccagc
 721 tctggcacgt tgcactgccc tgaccagcca tcctcctggg tgggctgcaa gctgagcctg
 781 gtcttcctgc agtactgcat catggccaac ttcttctggc tgctggtgga ggggctctac
 841 ctccacaccc tcctggtggc catgctcccc cctagaaggt gcttcctggc ctacctcctg
 901 atcggatggg gcctccccac cgtctgcatc ggtgcatgga ctgcggccag gctctactta
 961 gaagacaccg gttgctggga tacaaacgac cacagtgtgc cctggtgggt catacgaata
1021 ccgattttaa tttccatcat cgtcaatttt gtccttttca ttagtattat acgaattttg
1081 ctgcagaagt taacatcccc agatgtcggc ggcaacgacc agtctcagta caagaggctg
1141 gccaagtcca cgctcctgct tatcccgctg ttcggcgtcc actacatggt gtttgccgtg
1201 tttcccatca gcatctcctc caaataccag atactgtttg agctgtgcct cgggtcgttc
1261 cagggcctgg tggtggccgt cctctactgt ttcctgaaca gtgaggtgca gtgcgagctg
1321 aagcgaaaat ggcgaagccg gtgcccgacc ccgtccgcga gccgggatta cagggtctgc
1381 ggttcctcct tctcccacaa cggctcggag ggcgccctgc agttccaccg cgcgtcccga
1441 gcccagtcct tcctgcaaac ggagacctcg gtcatctagc cccacccctg cctgtcggac
1501 gcggcgggag gcccacggtt cggggcttct gcggggctga gacgccggct tcctccttcc
1561 agatgcccga gcaccgtgtc gggcaggtca gcgcggtcct gactccgtca agctggttgt
1621 ccactaaacc ccatacctgg
```

MORENO
JUAN
113
ING
MADRID
Tel.

1002

ABREVIATURAS

FSD = disfunción sexual femenina

FSAD = trastorno de la excitación sexual femenina

cAMP = 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico

cGMP = 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico

$P_{cAMP}$ = potenciador de cAMP

$P_{cGMP}$ = potenciador de cGMP

$A_{cAMP}$ = activador de cAMP

$A_{cGMP}$ = activador de cGMP

$AM_{cAMP}$ = modulador adverso de cAMP

$AM_{cGMP}$ = modulador adverso de cGMP

$I_{cAMP}$ = inhibidor de cAMP

$I_{cGMP}$ = inhibidor de cGMP

$I{:}I_{cAMP}$ = inhibidor de un inhibidor de cAMP

$I{:}I_{cGMP}$ = inhibidor de un inhibidor de cGMP

$I{:}AM_{cAMP}$ = inhibidor de un modulador adverso de cAMP

$I{:}AM_{cGMP}$ = inhibidor de un modulador adverso de cGMP

$U{:}A_{cAMP}$ = sobrerregulador de un activador de cAMP

$U{:}A_{cGMP}$ = sobrerregulador de un activador de cGMP

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

AC = adenilato ciclasa

A:AC = activador de AC

NEP = endopeptidasa neutra

I:NEP = inhibidor de NEP

VIP = péptido intestinal vasoactivo

VIPr = receptor de VIP (puede expresarse como VIPR)

$\mathrm{VIP}_n$ = receptor de un subtipo de VIP (tal como VIPR1, VIPR2)

A:VIPr = activador de VIPr

A:$\mathrm{VIP}_n$ = activador de $\mathrm{VIP}_n$

I:VIPr = inhibidor de VIPr

I:$\mathrm{VIP}_n$ = inhibidor de $\mathrm{VIP}_n$

I:I:VIPr = inhibidor de un inhibidor de VIPr

I:I:$\mathrm{VIP}_n$ = inhibidor de un inhibidor de $\mathrm{VIP}_n$

PDE = fosfodiesterasa

PDEn = familia de las PDE (por ejemplo PDE1, PDE2, etc.)

$\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ = PDE hidrolizante de cAMP

$\mathrm{PDE}_{\mathrm{cGMP}}$ = PDE hidrolizante de cGMP

I:PDE = inhibidor de una PDE

I:$\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ = inhibidor de una PDE hidrolizante de cAMP

I:$\mathrm{PDE}_{\mathrm{cAMP}}$ = inhibidor de una familia de PDE capaz de

PATRICIA ... MORENO
INGLES Y ALEMAN
... 13
MADRID
Telf.

hidrolizar cAMP

NPY = neuropéptido Y

NPYr = receptor de NPY (puede expresarse como NPYR)

NPY $Y_n$ = subtipo de receptor $Y_n$ de NPY (por ejemplo NPY $Y_1$) (por ejemplo NPYR1)

I:NPY = inhibidor de NPY

I:NPY $Y_n$ = inhibidor de NPY $Y_n$ (donde n denota el subtipo de receptor de NPY)

kDa = kilodalton

pb = par de bases

kb = kilopar de bases

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] Y ALEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Tel [illegible]

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el agente es un mediador de la vasorrelajación vaginal.

3. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la composición es para administración oral.

4. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

5. El uso según la reivindicación 4, en el que el agente es un mediador de la vasorrelajación vaginal.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
MADRID

6. El uso según las reivindicaciones 4 ó 5, en la que el mediamento es para administración oral.

7. Un procedimiento de tratamiento de una hembra (como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

8. Un procedimiento según la reivindicación 7 en el que el agente es un mediador de la vasorrelajación vaginal.

9. Un procedimiento según las reivindicaciones 7 u 8, en la que el agente se administra oralmente.

10. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto un agente con cAMP y medir la actividad de cAMP, siendo la potenciación del cAMP en presencia del agente indicativa de que el

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
113
MADRID
Tel

agente puede ser útil en el tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD.

11. Un procedimiento que comprende las etapas de:

(a) realizar el ensayo según la reivindicación 10.

(b) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente el cAMP, y

(c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados.

12. Un procedimiento de tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD, por potenciación de cAMP in vivo con un agente,

siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP en un procedimiento de ensayo in vitro,

siendo el procedimiento de ensayo in vitro el procedimiento de ensayo definido en la reivindicación 10.

13. El uso de un agente en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de FSD,

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

preferiblemente FSAD, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente el cAMP cuando se ensaya in vitro en un procedimiento de ensayo según la reivindicación 10.

14. Un agente identificado por el procedimiento de ensayo según la reivindicación 10.

15. Un agente según la reivindicación 14 para uso en medicina.

16. Un agente según la reivindicación 14 para uso en el tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD.

17. Un medicamento de administración oral para tratar FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el medicamento el agente según la reivindicación 14.

18. Un procedimiento de diagnóstico, comprendiendo el procedimiento aislar una muestra de una hembra, determinar si la muestra contiene una entidad presente en una cantidad tal que produzca FSD, preferiblemente FSAD, o si está en una cantidad como para producir FSD, preferiblemente FSAD, teniendo la entidad un efecto directo o indirecto sobre el nivel o la actividad de cAMP en los genitales sexuales de la hembra.

PATRICIA [illegible] MORENO

19. Una composición o estuche de diagnóstico que comprende medios para detectar una entidad en una muestra aislada de una hembra, pudiendo utilizarse los medios para determinar si la muestra contiene la entidad presente en una cantidad tal que produzca FSD, preferiblemente FSAD, o si está en una cantidad como para producir FSD, preferiblemente FSAD, teniendo la entidad un efecto directo o indirecto sobre el nivel o la actividad del cAMP en los genitales sexuales de la hembra.

20. Un modelo animal utilizado para identificar agentes capaces de tratar FSD, (en particular FSAD), comprendiendo el citado modelo un animal hembra anestesiado, incluyendo los medios para medir los cambios del flujo sanguíneo vaginal del citado animal a continuación de la estimulación del nervio pélvico de éste.

21. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente el cAMP para tratar FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: administrar un agente al modelo animal de la reivindicación 20, y medir cualquier potenciación del cAMP y/o aumento del flujo sanguíneo vaginal del citado animal.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

22. Un agente identificado por el procedimiento de ensayo de la reivindicación 21.

23. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente al menos uno de un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

24. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD, y siendo el citado agente al menos uno de un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

25. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente al menos uno de un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

26. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo vaginal, comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente al menos uno de un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

27. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal, y siendo el citado agente al menos uno de un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

28. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que por FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente, y siendo el citado agente al menos uno de un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

29. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 28, en la que el citado agente potencia el cAMP.

30. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el citado cAMP es

PATRICIA ROSA MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. [illegible] 113
Telf. 5[illegible] MADRID

cAMP endógeno (como se ha definido en la presente)

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
c/ [illegible], 113
Teléf. 519[illegible] - MADRID

## RESUMEN

## PRODUCTO FARMACEUTICO

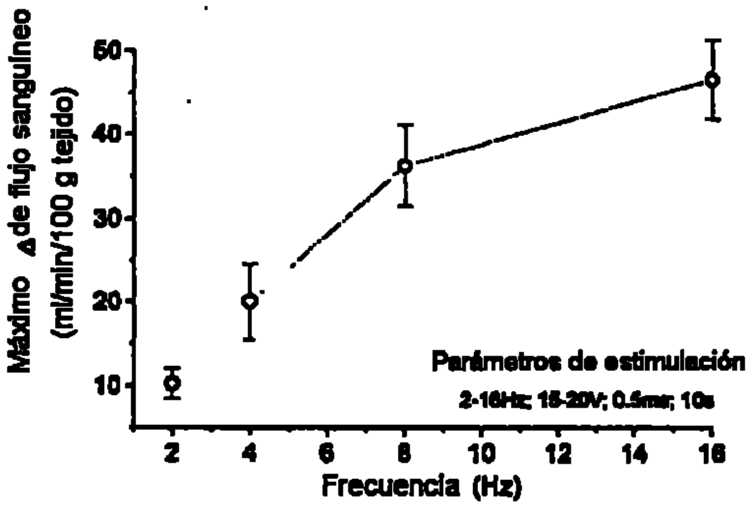
Se describe un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD. El procedimiento comprende suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad tal que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra. El agente puede mezclarse con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. [illegible] 113
Telf. [illegible] MADRID

1014

## Figura 1

Flujo sanguíneo vaginal. Relación de respuesta a la frecuencia entre la estimulación del nervio pélvico y el flujo sanguíneo máximo

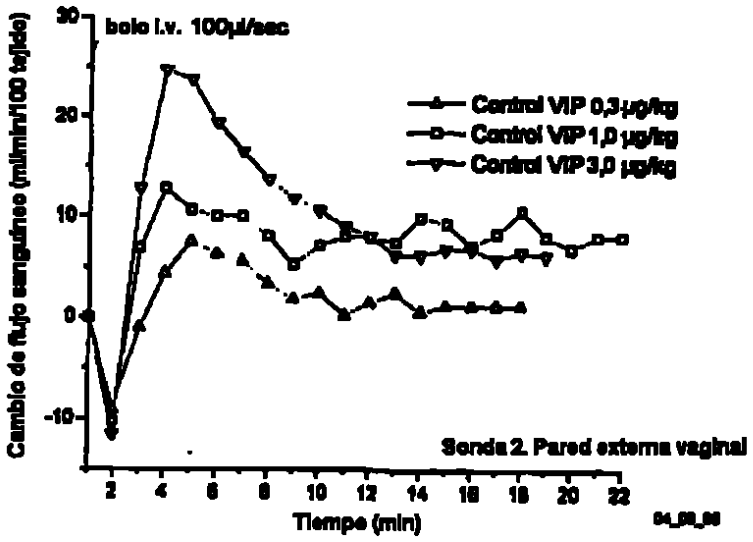


PATENT [illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

Figura 2

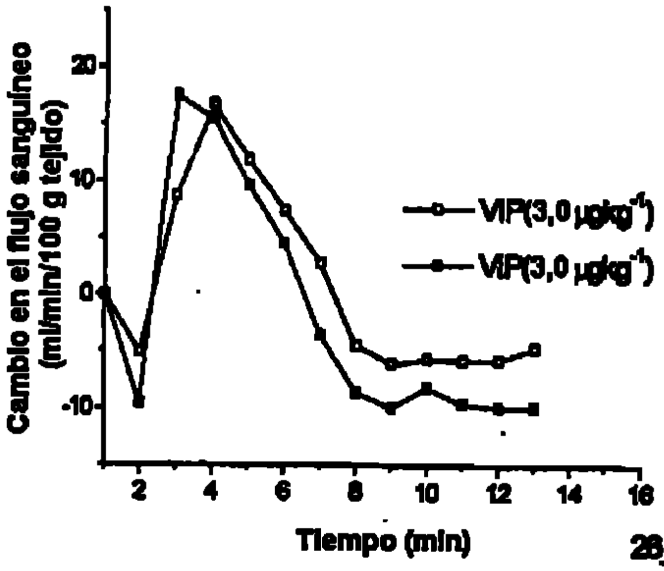
Efecto de VIP en el flujo sanguíneo en la pared vaginal

a



Efectos de infusiones repetidas de VIP sobre el flujo sanguíneo vaginal

b

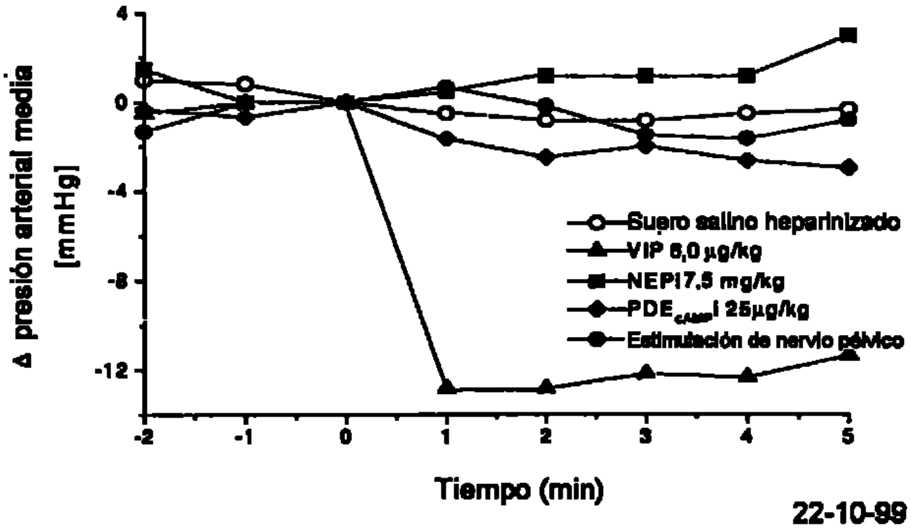


28_8_99

MORENO
MADRID

Figura 3

Efecto de VIP, de un inhibidor de NEP, de un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ o de la estimulación del nervio pélvico sobre la presión arterial media en conejo anestesiado

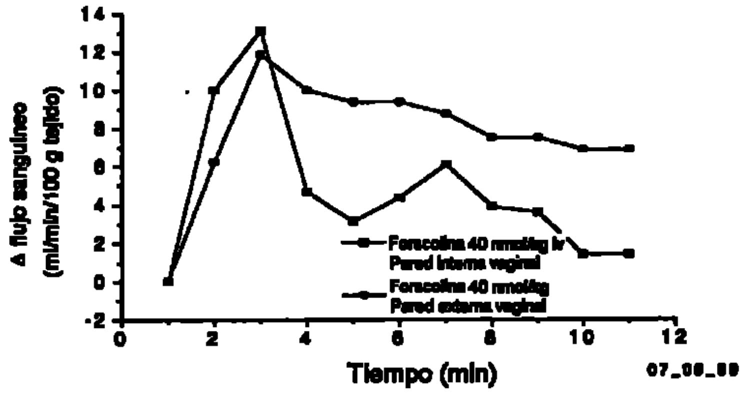


22-10-99

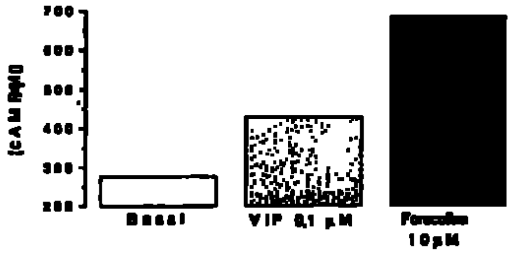
MADRID

## Figura 4

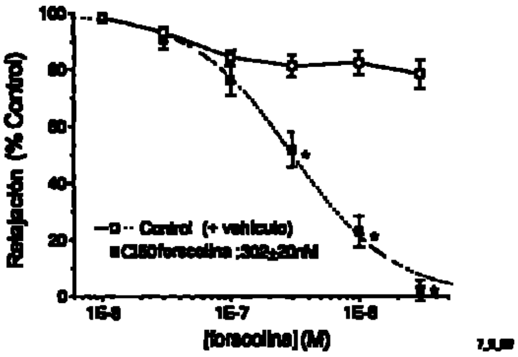
### 4a) La forscolina (un mimético de cAMP) aumenta el flujo sanguíneo vaginal en conejo anestesiado



### 4b) VIP estimula la producción de cAMP en vagina de conejo aislada



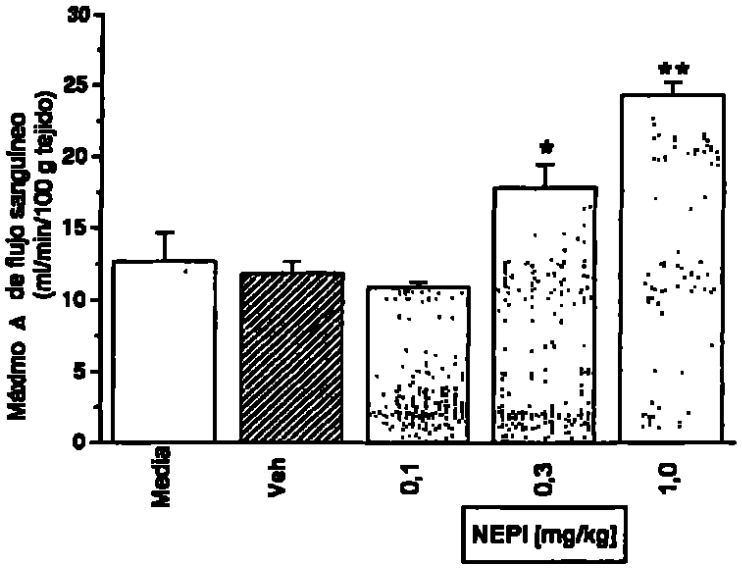
### 4c) Efecto relajante de la forscolina (un mimético de cAMP) sobre vagina de conejo aislada



PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

Figura 5

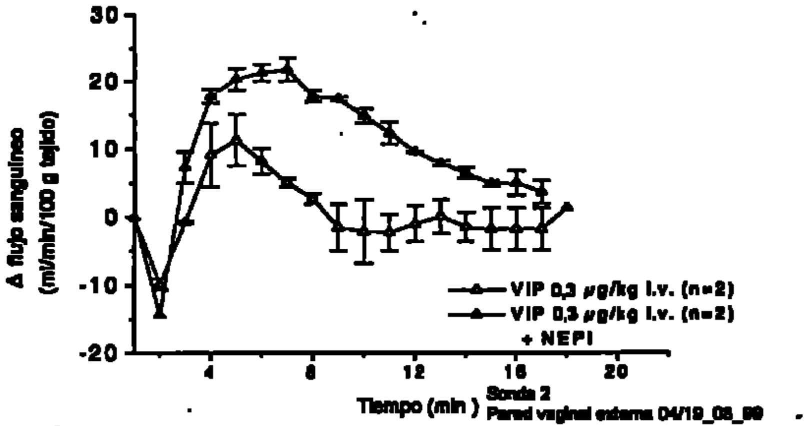
Efecto de un inhibidor de NEP sobre los cambios estimulados por el nervio pélvico en el flujo sanguíneo vaginal en conejo anestesiado



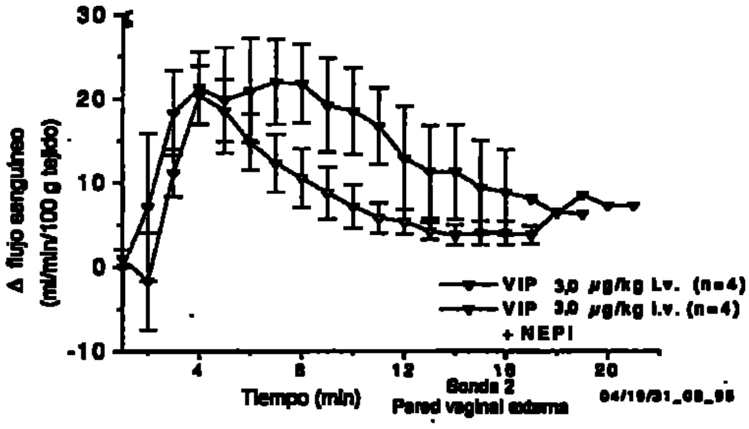
PATENTES [illegible] MORENO
[illegible] Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

Figura 6

Efecto de VIP (0,3 µg/kg, iv) sobre el flujo sanguíneo vaginal en presencia y ausencia de un inhibidor de NEP

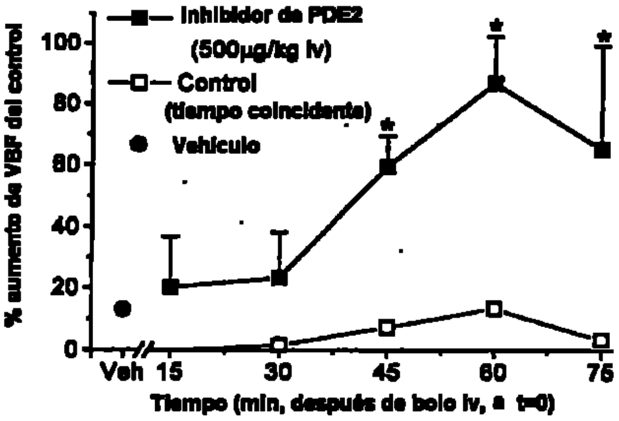


Efecto de VIP (3,0 µg/kg) sobre el flujo sanguíneo vaginal en presencia y ausencia de un inhibidor de NEP



MORENO
ALEMAN
13
MADRID

Figura 7

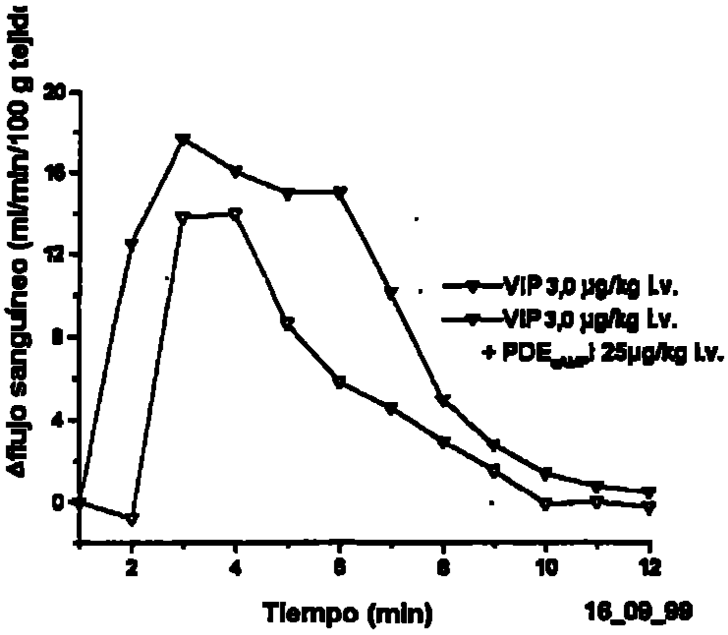


* P>0.01Ensayo t de Student pareado

MORENO
MAN
13
ADRID

Figura 8

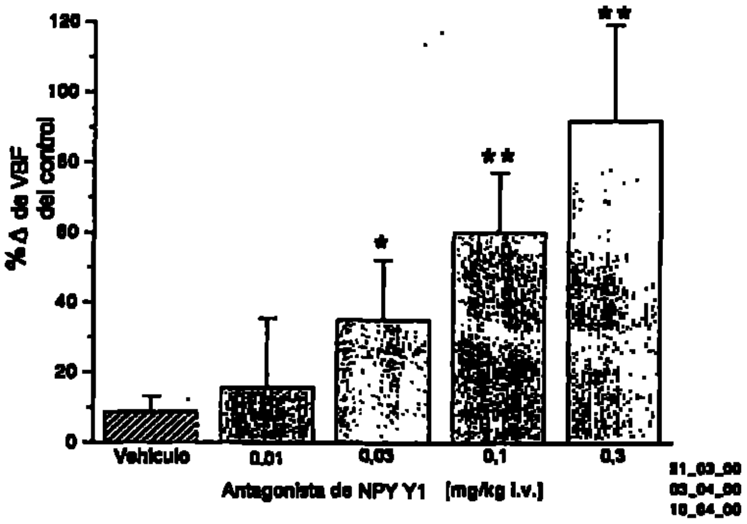
Efecto de un inhibidor de PDE$_{cAMP}$ sobre los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo vaginal



PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

Figura 9

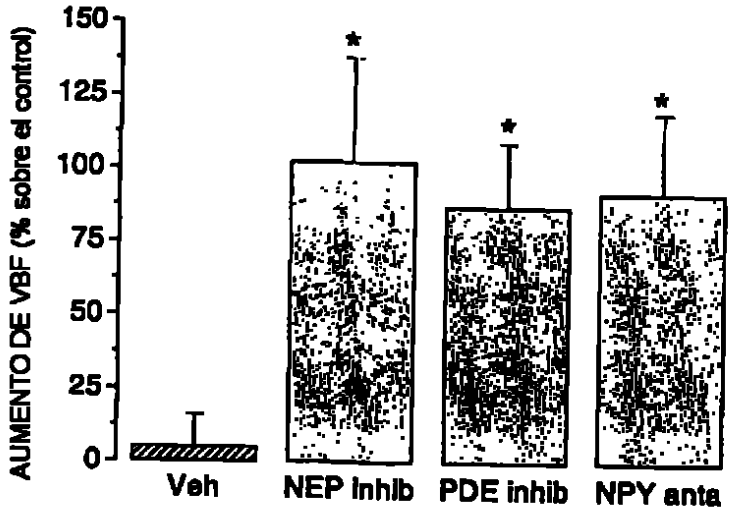
Efecto de un antagonista de NPY Y1 sobre los aumentos estimulados por nervio pélvico en el flujo sanguíneo vaginal en conejo anestesiado



MADRID

## Figura 10

La estimulación de la señalización de cAMP potencia los aumentos mediados por nervio en el flujo sanguíneo vaginal (VBF) en conejo



PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

Doña PATRICIA KOCH MORENO, intérprete jurado de inglés y alemán, certifica que la adjunta es traducción fiel y completa al español del documento adjunto redactado en inglés.

En Madrid, a 25 OCT 2000

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

PCS10343 PROV 2

1025

The Patent Office
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

I, the undersigned, being an officer duly authorised in accordance with Section 74(1) and (4) of the Deregulation & Contracting Out Act 1994, to sign and issue certificates on behalf of the Comptroller-General, hereby certify that annexed hereto is a true copy of the documents as originally filed in connection with the patent application identified therein.

In accordance with the Patents (Companies Re-registration) Rules 1982, if a company named in this certificate and any accompanying documents has re-registered under the Companies Act 1980 with the same name as that with which it was registered immediately before re-registration save for the substitution as, or inclusion as, the last part of the name of the words "public limited company" or their equivalents in Welsh, references to the name of the company in this certificate and any accompanying documents shall be treated as references to the name with which it is so re-registered.

In accordance with the rules, the words "public limited company" may be replaced by p.l.c., plc, P.L.C. or PLC.

Re-registration under the Companies Act does not constitute a new legal entity but merely subjects the company to certain additional company law rules.

Signed R. Mahoney

Dated 21 AUG 2000

**Patents : .m 1/77**

**Patents Act 1977**
**(Rule 16)**

THE PATENT OFFICE
26 MAY 2000
RECEIVED

The Patent Office

1026

& CO

30MAY00 E540687-42 D02246
_P01/7700 0.00-0013001.3

**The Patent Office**

**Cardiff Road**
**Newport**
**Gwent NP9 1RH**

# Request for a grant of a patent

*(See the notes on the back of this form. You can also get an explanatory leaflet from the Patent Office to help you fill in this form)*

---

1. Your reference — P007553GBP CTH

---

2. Patent application number
*(The Patent Office will fill in this part)*

26 MAY 2000

**0013001.3**

---

3. Full name, address and postcode of the or of each applicant
*(underline all surnames)*

Pfizer Limited
Ramsgate Road
Sandwich
Kent
CT13 9NJ

Patents ADP number *(if you know it)* — 00001271001

If the applicant is a corporate body, give the country/state of its incorporation — United Kingdom

---

4. Title of the invention — PHARMACEUTICAL

---

5. Name of your agent *(if you have one)* — D YOUNG & CO

"Address for service" in the United Kingdom to which all correspondence should be sent (including the postcode)

21 NEW FETTER LANE
LONDON
EC4A 1DA

Patents ADP number *(if you know it)* — 59006

✓

---

6. If you are declaring priority from one or more earlier patent applications, give the country and date of filing of the or each of these earlier applications and *(if you know it)* the or each application number

| | Country | Priority application number *(if you know it)* | Date of filing *(day/month/year)* |
|---|---|---|---|
| 1st | | | |
| 2nd | | | |
| 3rd | | | |

---

7. If this application is divided or otherwise derived from an earlier UK application, give the number and filing date of the earlier application

| Number of earlier application | Date of filing (day/month/year) |
|---|---|
| | |

| | | |
|---|---|---|
| 8. | **Is a statment of inventorship and of right to grant of a patent required in support of this request?** *(Answer 'Yes' if:*<br>*a) any applicant named in part 3 is not an inventor, or*<br>*b) there is an inventor who is not named as an applicant, or*<br>*c) any named applicant is a corporate body.*<br>*See note (d))* | YES |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 9. | Enter the number of sheets for any of the following items you are filing with this form. Do not count copies of the same document | Continuation sheets of this form | 0 |
| | | Description | 171 |
| | | Claim(s) | 4 |
| | | Abstract | 1 |
| | | Drawing(s) | 10 +10 (4 |
| 10. | If you are also filing any of the following, state how many against each item | Priority Documents | 0 |
| | | Translation of Priority Documents | 0 |
| | | Statment of inventorship and right to grant of a patent *(Patents Form 7/77)* | 0 |
| | | Request for preliminary examination and search *(Patents Form 9/77)* | 0 |
| | | Request for substantive examination *(Patents Form 10/77)* | 0 |
| | | Any other documents *(Please specify)* | 0 |

11. I/We request the grant of a Patent on the basis of this application.

Signature

D YOUNG & CO
Agents for the Applicants

Date

26 May 2000

12. Name and daytime telephone number of person to contact in the United Kingdom — Charles Harding — 023 80634816

**Warning**

*After an application for a patent has been filed, the Comptroller of the Patent Office will consider whether publication or communication of the invention should be prohibited or restricted under Section 22 of the Patents Act 1977. You will be informed if it is necessary to prohibit or restrict your invention in this way. Furthermore, if you live in the United Kingdom, Section 23 of the Patents Act 1977 stops you from applying for a patent abroad without first getting written permission from the Patent Office unless an application has been filed at least 6 weeks beforehand in the United Kingdom for a patent for the same invention and either no direction prohibiting publication or communication has been given, or any such direction has been revoked.*

**Notes**

*a) If you need help to fill in this form or you have any questions, please contact the Patent Office on 01645 500505.*

*b) Write your answers in capital letters using black ink or you may type them.*

*c) If there is not enough space for all the relevant details on any part of this form, please continue on a separate sheet of paper and write "see continuation sheet" in the relevant part(s). Any continuation sheets should be attached to this form.*

*d) If you answered 'Yes' Patents Form 7/77 will need to be filed.*

*e) Once you have filled in the form you must remember to sign and date it.*

*f) For details of the fee and ways to pay please contact the Patent Office.*

# PHARMACEUTICAL

## FIELD OF INVENTION

The present invention relates to a pharmaceutical that is useful for the treatment of female sexual dysfunction (FSD), in particular female sexual arousal dysfunction (FSAD).

The present invention also relates to a method of treatment of FSD, in particular FSAD.

The present invention also relates to assays to screen for compounds useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

For convenience, a list of abbreviations that are used in the following text is presented before the Claims section.

## FEMALE SEXUAL RESPONSE

The female sexual response phase of arousal is not easily distinguished from the phase of desire until physiological changes begin to take place in the vagina and clitoris as well as other sexual organs. Sexual excitement and pleasure are accompanied by a combination of vascular and neuromuscular events which lead to engorgement of the clitoris, labia and vaginal wall, increased vaginal lubrication and dilatation of the vaginal lumen (Levin, 1980; Ottesen, 1983; Levin, 1991; Levin, 1992; Sjoberg, 1992; Wagner, 1992; Schiavi *et al.*, 1995; Masters *et al.*, 1996; Berman *et al.*, 1999).

Vaginal engorgement enables transudation to occur and this process is responsible for increased vaginal lubrication. Transudation allows a flow of plasma through the epithelium and onto the vaginal surface, the driving force for which is increased blood flow in the vaginal capillary bed during the aroused state. In addition engorgement leads to an increase in vaginal length and luminal diameter, especially in the distal 2/3 of the vaginal canal. The luminal dilatation of the vagina is due to a combination of smooth muscle relaxation of its wall and skeletal muscle relaxation of the pelvic floor muscles. Some sexual pain disorders such as vaginismus are thought to be due, at least in part, by inadequate relaxation preventing dilatation of the vagina; it

has yet to be ascertained if this is primarily a smooth or skeletal muscle problem. (Levin, 1980; Ottesen, 1983; Levin, 1991; Levin, 1992; Sjoberg, 1992; Wagner, 1992; Schiavi *et al.*, 1995; Master *et al.*, 1996; Berman *et al.*, 1999).

The vasculature and micro vasculature of the vagina are innervated by nerves containing neuropeptides and other neurotransmitter candidates. These include calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NPY), nitric oxide synthase (NOS), substance P and vasoactive intestinal peptide (VIP) (Hoyle *et al.*, 1996). Nitric oxide synthase, which is often colocalised with VIP, displays a greater expression, immunologically, in the deep arteries and veins rather than in the blood vessels of the propria (Hoyle *et al.*, 1996).

## FEMALE SEXUAL DYSFUNCTION

It is known that some individuals can suffer from female sexual dysfunction (FSD).

FSD is best defined as the difficulty or inability of a woman to find satisfaction in sexual expression. FSD is a collective term for several diverse female sexual disorders (Leiblum, 1998, Berman *et al.*, 1999). The woman may have lack of desire, difficulty with arousal or orgasm, pain with intercourse or a combination of these problems. Several types of disease, medications, injuries or psychological problems can cause FSD. Treatments in development are targeted to treat specific subtypes of FSD, predominantly desire and arousal disorders.

The categories of FSD are best defined by contrasting them to the phases of normal female sexual response: desire, arousal and orgasm (Kaplan et al., 1979). Desire or libido is the drive for sexual expression. Its manifestations often include sexual thoughts either when in the company of an interested partner or when exposed to other erotic stimuli. In contrast, sexual arousal is the vascular response to sexual stimulation, an important component of which is vaginal lubrication and elongation of the vagina. Thus, sexual arousal, in contrast to sexual desire, is a response relating to genital (e.g. vaginal) blood flow and not necessarily sensitivity. Orgasm is the release of sexual tension that has culminated during arousal.

Hence, FSD occurs when a woman has an inadequate or unsatisfactory response in any of these phases, usually desire, arousal or orgasm. FSD categories include hypoactive sexual desire disorder, sexual arousal disorder, orgasmic disorders and sexual pain disorders.

Hypoactive sexual desire disorder is present if a woman has no or little desire to be sexual, and has no or few sexual thoughts or fantasies. This type of FSD can be caused by low testosterone levels, due either to natural menopause or to surgical menopause. Other causes include illness, medications, fatigue, depression and anxiety.

Sexual arousal disorder (FSAD) is characterised by inadequate genital response to sexual stimulation. The genitalia do not undergo the engorgement that characterises normal sexual arousal. The vaginal walls are poorly lubricated, so that intercourse is painful. Orgasms may be impeded. Arousal disorder can be caused by reduced oestrogen at menopause or after childbirth and during lactation, as well as by illnesses, with vascular components such as diabetes and atherosclerosis. Other causes result from treatment with diuretics, antihistamines, antidepressants eg SSRIs or antihypertensive agents.

Sexual pain disorders (includes dyspareunia and vaginismus) is characterised by pain resulting from penetration and may be caused by medications which reduce lubrication, endometriosis, pelvic inflammatory disease, inflammatory bowel disease or urinary tract problems.

The prevalence of FSD is difficult to gauge because the term covers several types of problem, some of which are difficult to measure, and because the interest in treating FSD is relatively recent. Many women's sexual problems are associated either directly with the female ageing process or with chronic illnesses such as diabetes and hypertension.

There are wide variations in the reported incidence and prevalence of FSD, in part explained by the use of differing evaluation criteria, but most investigators report that a significant proportion of otherwise healthy women have symptoms of one or more of the FSD subgroups.

By way of example, studies comparing sexual dysfunction in couples reveal that 63% of women had arousal or orgasmic dysfunction compared with 40% of men have erectile or ejaculatory dysfunction (Frank *et al.*, 1978).

However, the prevalence of female sexual arousal disorder varies considerably from survey to survey. In a recent National Health and Social Life Survey 19% of women reported lubrication difficulties whereas 14% of women in an outpatient gynaecological clinic reported similar difficulties with lubrication (Rosen *et al.*, 1993).

Several studies have also reported dysfunction with sexual arousal in diabetic women (up to 47%), this included reduced vaginal lubrication (Wincze *et al.*, 1993). There was no association between neuropathy and sexual dysfunction.

Numerous studies have also shown that between 11-48% of women overall may have reduced sexual desire with age. Similarly, between 11-50% of women report problems with arousal and lubrication, and therefore experience pain with intercourse. Vaginismus is far less common, affecting approximately 1% of women.

Studies of sexually experienced women have detailed that 5-10% have primary anorgasmia. Another 10% have infrequent orgasms and a further 10% experience them inconsistently (Spector *et al.*, 1990).

Because FSD consists of several subtypes that express symptoms in separate phases of the sexual response cycle, there is not a single therapy. Current treatment of FSD focuses principally on psychological or relationship issues. Treatment of FSD is gradually evolving as more clinical and basic science studies are dedicated to the investigation of this medical problem. Female sexual complaints are not all psychological in pathophysiology, especially for those individuals who may have a component of vasculogenic dysfunction (eg FSAD) contributing to the overall female sexual complaint. There are at present no drugs licensed for the treatment of FSD. Empirical drug therapy includes oestrogen administration (topically or as hormone replacement therapy), androgens or mood-altering drugs such as buspirone or trazodone. These treatment options are often unsatisfactory due to low efficacy or unacceptable side effects.

Since interest is relatively recent in treating FSD pharmacologically, therapy consists of the following:- psychological counselling, over-the-counter sexual lubricants, and investigational candidates, including drugs approved for other conditions. These medications consist of hormonal agents, either testosterone or combinations of oestrogen and testosterone and more recently vascular drugs, that have proved effective in male erectile dysfunction. None of these agents has been demonstrated to be very effective in treating FSD.

## FEMALE SEXUAL AROUSAL DISORDER (FSAD)

The Diagnostic and Statistical Manual (DSM) IV of the American Psychiatric Association defines Female Sexual Arousal Disorder (FSAD) as being:

> *"a persistent or recurrent inability to attain or to maintain until completion of the sexual activity adequate lubrication-swelling response of sexual excitement. The disturbance must cause marked distress or interpersonal difficulty."*

The arousal response consists of vasocongestion in the pelvis, vaginal lubrication and expansion and swelling of the external genitalia. The disturbance causes marked distress and/or interpersonal difficulty. Studies investigating sexual dysfunction in couples reveals that up to 63% of women have arousal or orgasmic dysfunction.

FSAD is a highly prevalent sexual disorder affecting pre-, peri- and post menopausal (±HRT) women. It is associated with concomitant disorders such as depression, cardiovascular diseases, diabetes and UG disorders.

The primary consequences of FSAD are lack of engorgement/swelling, lack of lubrication and lack of pleasurable genital sensation. The secondary consequences of FSAD are reduced sexual desire, pain during intercourse and difficulty in achieving an orgasm.

It has recently been hypothesised that there is a vascular basis for at least a proportion of patients with symptoms of FSAD (Goldstein *et al.*, 1998) with animal data supporting this view (Park *et al.*, 1997).

Drug candidates for treating FSAD, which are under investigation for efficacy, are primarily erectile dysfunction therapies that promote circulation to the male genitalia. They consist of two types of formulation, oral or sublingual medications (Apomorphine, Phentolamine, Sildenafil), and prostaglandin ($PGE_1$) that are injected or administered transurethrally in men, and topically to the genitalia in women.

The present invention seeks to provide an effective means of treating FSAD.

## SUMMARY ASPECTS OF THE PRESENT INVENTION

The present invention is based on findings that FSAD is associated with reduced genital blood flow. Treatment of women with FSAD can be achieved by enhancement of genital blood flow with vasoactive agents. In our studies, we have clearly shown that cAMP-mediates vaginal vasorelaxation and that vaginal blood flow can be enhanced/potentiated by elevation of cAMP levels. This is a seminal finding.

In this respect, no one has previously proposed that FSAD can be treated in such a way – i.e. by direct or indirect elevation of cAMP levels. Moreover, there are no teachings in the art to suggest that FSAD was associated with a detrimental modulation of cAMP activity and/or levels or that cAMP is responsible for mediating vaginal vasorelaxation. Hence, the present invention is surprising.

In addition, we have found that by using agents of the present invention it is possible to treat FSAD by increasing lubrication in the vagina, and optionally in the clitoris.

Thus, in a broad aspect, the present invention relates to the use of a cAMP potentiator to treat FSD, in particular FSAD.

The present invention is advantageous as it provides a means for restoring a normal sexual arousal response - namely increased genital blood flow leading to vaginal and labial engorgement. This will result in increased vaginal lubrication *via* plasma transudation, increased vaginal compliance and increased vaginal sensitivity. Hence, the present invention provides a means to restore, or mimic, the normal sexual arousal response.

1030 ~~1031~~

## DETAILED ASPECTS OF THE PRESENT INVENTION

In one aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient. Here, the composition (like any of the other compositions mentioned herein) may be packaged for subsequent use in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In another aspect, the present invention relates to the use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD.

In a further aspect, the present invention relates to a method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

In a further aspect, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In a further aspect, the present invention relates to a process comprising the steps of: (a) performing the assay according to the present invention; (b) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP activity; and (c) preparing a quantity of those one or more identified agents.

With this aspect, the agent identified in step (b) may be modified so as to, for example, maximise activity and then step (a) may be repeated. These steps may be repeated until the desired activity or pharmokinetic profile has been achieved.

Thus, in a further aspect, the present invention relates to a process comprising the steps of: (a1) performing the assay according to the present invention; (b1) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP activity, (b2) modifiying one or more of said identified agents; (a2) optionally repeating step (a1); and (c) preparing a quantity of those one or more identified agents (i.e. those that have been modified).

In a further aspect, the present invention relates to a method of treating FSD, in particular FSAD, by potentiating *in vivo* cAMP with an agent; wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP in an *in vitro* assay method; wherein the *in vitro* assay method is the assay method according to the present invention.

In a further aspect, the present invention relates to the use of an agent in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of FSD, in particular FSAD, wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP when assayed *in vitro* by the assay method according to the present invention.

In a further aspect, the present invention relates to an animal model used to identify agents capable of treating FSD (in particular FSAD), said model comprising an anaesthetised female animal including means to measure changes in vaginal blood flow of said animal following stimulation of the pelvic nerve thereof.

In a further aspect, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSAD, the assay method comprising: administering an agent to the animal model of the present invention; and measuring any potentiation of cAMP and/or increase in blood flow in the vagina of said animal.

For ease of reference, these and further aspects of the present invention are now discussed under appropriate section headings. However, the teachings under each section are not necessarily limited to each particular section.

1031

~~1022~~

PREFERABLE ASPECTS

Preferably, the agent is for the treatment of FSAD.

Preferably, the agent is a mediator of vaginal vasorelaxation.

In one embodiment, preferably the agent is for oral administration.

In another embodiment, the agent may be for topical administration.

For some applications, preferably the agent has an indirect potentiating effect on cAMP. Alternatively expressed, for some applications, preferably the agent does not have a direct potentiating effect on cAMP. An example of an agent that has a direct potentiating effect is exogenously applied VIP. Nevertheless, it is to be understood that in this preferred aspect the agent may have an indirect potentiating effect on cAMP by acting on naturally found and laturally located directly acting agents – such as naturally found and located VIP.

For some applications, preferably the agent is an inhibitor – i.e. it is capable of exhibiting an inhibitory function.

For some applications, preferably the agent is an I:PDE (sometimes written as PDEi), more preferably an I:PDEII (sometimes written as I:PDE2 or PDEIIi or PDE2*i*).

For some applications, preferably the agent is a I:NEP (sometimes written as NEPi).

For some applications, preferably the agent is a I:NPY (sometimes written as NPYi).

For some applications, preferably the agent is a selective I:PDEII.

For some applications, preferably the agent is a selective I:NEP.

For some applications, preferably the agent is a selective I:NPY.

For some applications, preferably the agent does not cause - or is administered in such a fashion so that it does not cause – a prolonged drop in blood pressure (e.g. over a period of about 5 minutes or more). In this embodiment, if the agent is to be delivered topically then that agent may have the ability to cause a drop in blood pressure (such as if it were to be delivered intraveneously), provided that in the topical application minimal levels of the agent pass into the blood stream. For an oral agent, it is preferred that the agent does not cause a prolonged drop in blood pressure.

In a preferred aspect, the agent does not cause - or is administered in such a fashion so that it does not cause – a large increase in heart rate.

## TREATMENT

It is to be appreciated that all references herein to treatment include curative, palliative and prophylactic treatment.

## ENDOGENOUS cAMP

In a highly preferred embodiment the agent of the present invention potentiates endogenous cAMP – such as potentiates endogenous cAMP levels.

Here, the term "endogenous cAMP" means cAMP that arises from sexual stimulation (sexual arousal). Hence, the term does not encompass cAMP levels that will be elevated independent of sexual drive.

Thus, treatment of FSAD according to the present invention is to directly or indirectly potentiate endogenous cAMP signalling and thus enhance the natural sexual arousal response - and optionally vaginal blood flow/lubrication. This may be achieved by use of an inhibitor of NEP (EC 3.4.24.11) or a cAMP-hydrolysing PDE inhibitor or a NPY receptor antagonist. Thus the treatment method of the present invention restores or mimicks the normal arousal response.

## SEXUAL STIMULATION

The present invention also encompasses administration of the agent of the present invention before and/or during sexual stimulation. Here the term "sexual stimulation" may be synonymous with the term "sexual arousal".

This aspect of the present invention is advantageous because it provides systemic selectivity. The natural cascade only occurs at the genitalia and not the heart etc, hence it would be possible to achieve a selective effect on the genitalia.

Thus, for some aspects of the present invention it is highly desirable that there is a sexual stimulation step. We have found that this step can provide systemic selectivity. Here, "sexual stimulation" may be one or more of a visual stimulation, a physical stimulation or a thought stimulation.

Thus, preferably the agents of the present invention are delivered before or during sexual stimulation, particulaly when those agents are for oral delivery.

Hence, for this preferred aspect, the present invention provides for the use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; and wherein said female is sexually stimulated before or during administration of said medicament.

Preferably, the present invention provides for the use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein said female is sexually stimulated before or during administration of said medicament; and wherein said medicament is delivered orally to said female.

In addition, for this preferred aspect, the present invention provides for a method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said female is sexually stimulated before or during administration of said agent.

Preferably, the present invention provides for a method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; wherein said female is sexually stimulated before or during administration of said agent; and wherein said agent is delivered orally to said female.

## POTENTIATING cAMP

As used herein with reference to cAMP, the term "potentiating" includes any one or more of: increasing the effectiveness of cAMP, increasing the levels of cAMP, increasing the activity of cAMP, decreasing the level of cAMP degradation, decreasing the level of cAMP inhibition.

The potentiating effect can be a direct effect. An example of a direct effect would be upregulation of cAMP levels by an agent that increases the expression thereof.

Alternatively, the potentiating effect could be an indirect effect. An example of such an effect would be action on a substance that would otherwise inhibit and/or reduce the levels and/or activity of cAMP. Another example of such an effect would be increasing the action of a substance that increases the effectiveness of cAMP, increases the levels of cAMP, increases the activity of cAMP, decreases the level of cAMP degradation, or decreases the level of cAMP inhibition.

In the alternative, the agent may even act as a cAMP mimetic.

## cAMP Mimetic

As used herein, the term "cAMP mimetic" means an agent that can act in a similar fashion (e.g. have a similar biological profile and effect) to cAMP in the female sexual genitalia and, in doing so, does any one or more of: increases the effectiveness of cAMP like moieties, increases the levels of cAMP like moieties, increases the activity of cAMP like moieties, decreases the level of degradation of cAMP like moieties, decreases the level of inhibition of cAMP like moieties.

Thus, in one aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

Thus, in another aspect, the present invention relates to the use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

Thus, in a further aspect, the present invention relates to a method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to mimic potentiation of cAMP levels in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

An example of a cAMP mimetic would be forskolin. Here we have found that forskolin increases vaginal blood flow and it can also act as a vaginal relaxant.

In a preferred aspect, the cAMP mimetic is administered orally.

## ACTIVATOR OF cAMP

As used herein, the term "activator of cAMP" means a substance that controls or releases cAMP in the female sexual genitalia. The control may be direct or indirect. For ease of reference, we refer to these substances as $A_{cAMP}$.

## TARGET

The term "target" as used herein with reference to the present invention means any substance that is cAMP, an $A_{cAMP}$, an $I_{cAMP}$, or an $AM_{cAMP}$. Otherwise expressed, the target can be referred to as a $P_{cAMP}$ target.

The target for the agent of the present invention may be an amino acid sequence and/or a nucleotide sequence encoding same and/or an expression unit responsible for the expression of same and/or a modulator of same.

The target may even be a combination of such targets.

## AGENT

The agent may be any suitable agent that can act as a $P_{cAMP}$.

The agent can be an amino acid sequence or a chemical derivative thereof. The substance may even be an organic compound or other chemical. The agent may even be a nucleotide sequence - which may be a sense sequence or an anti-sense sequence. The agent may even be an antibody.

Thus, the term "agent" includes, but is not limited to, a compound which may be obtainable from or produced by any suitable source, whether natural or not.

The agent may be designed or obtained from a library of compounds which may comprise peptides, as well as other compounds, such as small organic molecules, such as lead compounds.

By way of example, the agent may be a natural substance, a biological macromolecule, or an extract made from biological materials such as bacteria, fungi, or animal (particularly mammalian) cells or tissues, an organic or an inorganic molecule, a synthetic agent, a semi-synthetic agent, a structural or functional mimetic, a peptide, a peptidomimetics, a derivatised agent, a peptide cleaved from a whole protein, or a peptides synthesised synthetically (such as, by way of example; either using a peptide synthesizer or by recombinant techniques or combinations thereof, a recombinant agent, an antibody, a natural or a non-natural agent, a fusion protein or equivalent thereof and mutants, derivatives or combinations thereof.

As used herein, the term "agent" may be a single entity or it may be a combination of agents.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:NEP – that organic compound may typically comprise an amide group (i.e. –

1034

N(H)-C(O)- or even –C(O)-N(H)-) and one or more hydrocarbyl groups. Here, the term "hydrocarbyl group" means a group comprising at least C and H and may optionally comprise one or more other suitable substituents. Examples of such substituents may include halo-, alkoxy-, nitro-, an alkyl group, a cyclic group etc. In addition to the possibility of the substituents being a cyclic group, a combination of substituents may form a cyclic group. If the hydrocarbyl group comprises more than one C then those carbons need not necessarily be linked to each other. For example, at least two of the carbons may be linked *via* a suitable element or group. Thus, the hydrocarbyl group may contain hetero atoms. Suitable hetero atoms will be apparent to those skilled in the art and include, for instance, sulphur, nitrogen and oxygen. For some applications, preferably the agent comprises at least one cyclic group. For some applications, preferably the agent comprises at least one cyclic group linked to another hydrocarbyl group via an amide bond. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:PDE – that organic compound may typically comprise two or more linked hydrocarbyl groups. For some applications, preferably the agent comprises at least two cyclic groups – wherein one of which cyclic groups may be a fused cyclic ring structure. For some applications, preferably at least one of the cyclic groups is a heterocyclic group. For some applications, preferably the heterocyclic group comprises at least one N in the ring. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:NPY – that organic compound may typically comprise two or more linked hydrocarbyl groups. For some applications, preferably the agent comprises at least two cyclic groups – optionally wherein one of which cyclic groups may be a fused cyclic ring structure. For some applications, at least one of the cyclic groups is a heterocyclic group. For some applications, preferably the heterocyclic group comprises at least one N in the ring. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

The agent may contain halo groups. Here, "halo" means fluoro, chloro, bromo or iodo.

The agent may contain one or more of alkyl, alkoxy, alkenyl, alkylene and alkenylene groups – which may be unbranched- or branched-chain.

The agent may be in the form of a pharmaceutically acceptable salt – such as an acid addition salt or a base salt – or a solvate thereof, including a hydrate thereof. For a review on suitable salts see Berge et al, J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19.

Suitable acid addition salts are formed from acids which form non-toxic salts and examples are the hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, sulphate, bisulphate, nitrate, phosphate, hydrogen phosphate, acetate, maleate, fumarate, lactate, tartrate, citrate, gluconate, succinate, saccharate, benzoate, methanesulphonate, ethanesulphonate, benzenesulphonate, p-toluenesulphonate and pamoate salts.

Suitable base salts are formed from bases which form non-toxic salts and examples are the sodium, potassium, aluminium, calcium, magnesium, zinc and diethanolamine salts.

A pharmaceutically acceptable salt of an agent of the present invention may be readily prepared by mixing together solutions of the agent and the desired acid or base, as appropriate. The salt may precipitate from solution and be collected by filtration or may be recovered by evaporation of the solvent.

The agent of the present invention may exisit in polymorphic form.

The agent of the present invention may contain one or more asymmetric carbon atoms and therefore exists in two or more stereoisomeric forms. Where an agent contains an alkenyl or alkenylene group, cis (E) and trans (Z) isomerism may also occur. The present invention includes the individual stereoisomers of the agent and; where appropriate, the individual tautomeric forms thereof, together with mixtures thereof.

Separation of diastereoisomers or cis and trans isomers may be achieved by conventional techniques, e.g. by fractional crystallisation, chromatography or H.P.L.C. of a stereoisomeric mixture of the agent or a suitable salt or derivative thereof. An individual enantiomer of the agent may also be prepared from a corresponding optically pure intermediate or by resolution, such as by H.P.L.C. of the corresponding racemate using a suitable chiral support or by fractional crystallisation of the diastereoisomeric salts formed by reaction of the corresponding racemate with a suitable optically active acid or base, as appropriate.

The present invention also includes all suitable isotopic variations of the agent or a pharmaceutically acceptable salt thereof. An isotopic variation of an agent of the present invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof is defined as one in which at least one atom is replaced by an atom having the same atomic number but an atomic mass different from the atomic mass usually found in nature. Examples of isotopes that can be incorporated into the agent and pharmaceutically acceptable salts thereof include isotopes of hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, phosphorus, sulphur, fluorine and chlorine such as $^{2}H$, $^{3}H$, $^{13}C$, $^{14}C$, $^{15}N$, $^{17}O$, $^{18}O$, $^{31}P$, $^{32}P$, $^{35}S$, $^{18}F$ and $^{36}Cl$, respectively. Certain isotopic variations of the agent and pharmaceutically acceptable salts thereof, for example, those in which a radioactive isotope such as $^{3}H$ or $^{14}C$ is incorporated, are useful in drug and/or substrate tissue distribution studies. Tritiated, i.e., $^{3}H$, and carbon-14, i.e., $^{14}C$, isotopes are particularly preferred for their ease of preparation and detectability. Further, substitution with isotopes such as deuterium, i.e., $^{2}H$, may afford certain therapeutic advantages resulting from greater metabolic stability, for example, increased *in vivo* half-life or reduced dosage requirements and hence may be preferred in some circumstances. Isotopic variations of the agent of the present invention and pharmaceutically acceptable salts thereof of this invention can generally be prepared by conventional procedures using appropriate isotopic variations of suitable reagents.

It will be appreciated by those skilled in the art that the agent of the present invention may be derived from a prodrug. Examples of prodrugs include entities that have certain protected group(s) and which may not possess pharmacological activity as such, but may, in certain instances, be administered (such as orally or parenterally) and thereafter metabolised in the body to form the agent of the present invention which are pharmacologically active.

It will be further appreciated that certain moieties known as "pro-moieties", for example as described in "Design of Prodrugs" by H. Bundgaard, Elsevier, 1985 (the disclosured of which is hereby incorporated by reference), may be placed on appropriate functionalities of the agents. Such prodrugs are also included within the scope of the invention.

The $P_{cAMP}$ may do any one or more of: directly or indirectly increase the effectiveness of cAMP, directly or indirectly increase the levels of cAMP, directly or indirectly increase the activity of cAMP, directly or indirectly decrease the level of cAMP degradation, directly or indirectly decrease the level of cAMP inhibition.

Preferably, the agent directly or indirectly increases cAMP levels in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

More preferably, the agent directly or indirectly selectively increases cAMP levels in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

More preferably, the agent directly or indirectly selectively increases cAMP levels wherein said cAMP is sexually arousal induced cAMP.

In a highly preferred aspect, the agent of the present invention increases the relative amount of sexual arousal induced cAMP.

For some applications, the agent selectively treats FSAD.

In one aspect, the agent may inhibit or antagonise a suitable target and in doing so potentiate cAMP levels in the female sexual genitalia. In the text, we have used the term inhibitor to mean an inhibitor and/or antagonist.

In another aspect, the agent may activate or agonise a suitable target and in doing so potentiate cAMP levels in the female sexual genitalia. In the text, we have used the terms activator and upregulator inhibitor to mean activator and/or upregulator and/or agonist.

Thus, the agent may agonise, antagonise, upregulate, or inhibit a suitable target.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

Preferably, the agent may selectively agonise, selectively antagonise, selectively upregulate, or selectively inhibit a suitable target.

Preferably, the agent may selectively agonise, selectively antagonise, selectively upregulate, or selectively inhibit a selective, suitable target.

The agent of the present invention may also be capable of displaying one or more other beneficial functional properties. By way of example, the agent of the present invention may potentiate cAMP as well as potentiating cGMP. For some applications (such as a topical application), the agent may also display an ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitory action. For some applications (such as with particular patient types), such agents (i.e. those that also display ACE inhibitory action) may not be suitable for oral administration. For some applications, the agent may also display an ECE (endothelium converting enzyme) inhibitory action.

In a highly preferred embodiment, the agent is not exogenously administered VIP.

This is because there has been a report that VIP infusions lead to significant cardiovascular adverse effects such as increases in heart rate and a decrease in diastolic arterial blood pressure (Ottesen 1983, 1987, 1995)

In addition, even though, Ottesen and co-workers have demonstrated that VIP induces increases in vaginal blood flow and lubrication in healthy volunteers, the mechanism by which VIP is exerting it's effects are unclear. In the literature, there are a number of examples of VIP signalling through different second messenger systems eg cGMP/guanylate cyclase (Ashur-Fabian, 1999); carbon monoxide (CO)/heme oxygenase (Fan et al.,1998) and cAMP/adenylate cyclase (Foda,1995; Schoeffter, 1985; Gu, 1992). This is exemplified by a recent report which describes how the vasorelaxant effects of VIP in the uterine artery can be explained by the release of nitric oxide. (Jovanovic, 1998). Again, there is also evidence for VIP modulating nitric oxide (NO)/cGMP in male urogenital function (Kim, 1994).

In the literature it has been reported that VIP has no effect on cAMP levels in vaginal smooth muscle cell cultures (see Traish, A., Moreland, R.B., Huang, Y., *et al.* (1999). Development of human and rabbit vaginal smooth muscle cell cultures: Effects of vasoactive agents on intracellular levels of cyclic nucleotides. *Mol. Cell Biol. Res. Comm.*, 2, 131-137).

Hence, it is desirable that the agent is not exogeneously applied VIP on its own. However, the present invention may encompass combinations of agents, wherein one of those agents is VIP. However, again, it is preferred that none of the agents is exogeneously applied VIP for the aforesaid reasons.

The agent may be used in combination with one or more other pharmaceutically active agents, such as a $P_{cGMP}$ (such as Sildenafil) and/or a centrally acting pharmaceutical (e.g. a dopamine agonist, such as apomorphine). Teachings on the use of apomorphine as a pharmaceutical may be found in US-A-5945117. In that particular document, apomorphine is delivered sub-lingually. In addition, or in the alternative, the agent may be used in combination with one or more of: one or more of a PDE5 inhibitor (eg sildenafil, vardenafil (Bayer BA 38-9456) and IC351 (Icos Lilly)), one or more of a dopamine receptor agonist (eg apomorphine), one or more of a melanocortin receptor agonist (eg Melanotan II), one or more of a potassium channel opener (eg a KATP channel opener and/or a calcium activated potassium channel opener (eg minoxidil, nicorandil)), one or more of a hormone replacement therapy (eg HRT) agent, one or more of a testosterone replacement agent (inc DHEA (dehydroandrostendione)), one or more of an estrogen agonists (eg Lasofoxifene), one or more of a serotonin receptor agonist, one or more of a prostinoid receptor agonist (eg alprostadil).

If a combination of active agents are administered, then they may be administered simultaneously, separately or sequentially.

For some applications, preferably the agent has a $K_i$ value of less than about 100 nM, preferably less than about 75 nM, preferably less than about 50 nM, preferably less than about 25 nM, preferably less than about 20 nM, preferably less than about 15 nM, preferably less than about 10 nM, preferably less than about 5 nM.

For some applications, preferably the agent has a $K_b$ value of less than about 100 nM, preferably less than about 75 nM, preferably less than about 50 nM, preferably less than about 25 nM, preferably less than about 20 nM, preferably less than about 15 nM, preferably less than about 10 nM, preferably less than about 5 nM.

For some applications, preferably the agent has a $K_a$ value of less than about 100 nM, preferably less than about 75.nM, preferably less than about 50 nM, preferably less than about 25 nM, preferably less than about 20 nM, preferably less than about 15 nM, preferably less than about 10 nM, preferably less than about 5 nM.

For some applications, preferably the agent has at least about a 100 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 150 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 200 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 250 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 300 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 350 fold selectivity to the desired target.

For some applications, the agent may be a vasoactive agent.

## CHEMICAL SYNTHESIS METHODS

Typically the agent of the present invention will be prepared by chemical synthesis techniques.

The agent or target of the present invention or variants, homologues, derivatives, fragments or mimetics thereof may be produced using chemical methods to synthesize the agent in whole or in part. For example, peptides can be synthesized by solid phase techniques, cleaved from the resin, and purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g., Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY). The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman degradation procedure; Creighton, *supra*).

Direct synthesis of the agent or variants, homologues, derivatives, fragments or mimetics thereof can be performed using various solid-phase techniques (Roberge JY *et al* (1995) Science 269: 202-204) and automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 43 1 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) in accordance with the instructions provided by the manufacturer. Additionally, the amino acid sequences comprising the agent or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with a sequence from other subunits, or any part thereof, to produce a variant agent, such as, for example, a variant PDE, NEP or NPY.

In an alternative embodiment of the invention, the coding sequence of the agent or variants, homologues, derivatives, fragments or mimetics thereof may be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see

Caruthers MH *et al* (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23, Horn T *et al* (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

## MIMETIC

As used herein, the term "mimetic" relates to any chemical which includes, but is not limited to, a peptide, polypeptide, antibody or other organic chemical which has the same qualitative activity or effect as a reference agent to target.

## CHEMICAL DERIVATIVE

The term "derivative" or "derivatised" as used herein includes chemical modification of an agent. Illustrative of such chemical modifications would be replacement of hydrogen by a halo group, an alkyl group, an acyl group or an amino group.

## CHEMICAL MODIFICATION

In one embodiment of the present invention, the agent may be a chemically modified agent.

The chemical modification of an agent of the present invention may either enhance or reduce hydrogen bonding interaction, charge interaction, hydrophobic interaction, Van Der Waals interaction or dipole interaction between the agent and the target.

In one aspect, the identified agent may act as a model (for example, a template) for the development of other compounds.

## RECOMBINANT METHODS

Typically the target of the present invention for use in the assay of the present invention may be prepared by recombinant DNA techniques.

## POTENTIATING cGMP

As used herein with reference to cGMP, the term "potentiating" includes any one or more of: increasing the effectiveness of cGMP, increasing the levels of cGMP,

10356

increasing the activity of cGMP, decreasing the level of cGMP degradation, decreasing the level of cGMP inhibition.

The potentiating effect can be a direct effect. Alternatively, it could be a secondary effect and/or a downstream effect.

Here, preferably, the agent that potentiates cGMP acts on a $I_{cGMP}$ and/or an $AM_{cGMP}$ wherein the modulator of cGMP has an adverse effect on cGMP, such that the agent reduces and/or eliminates and/or masks and/or diverts the detrimental effect of the $I_{cGMP}$ and/or the $AM_{cGMP}$ towards cGMP.

Hence, the present invention encompasses a combination of one or more $I:I_{cAMP}$ and one or more $I:I_{cGMP}$.

In one aspect, the $I:I_{cGMP}$ is a $I:PDE_{cGMP}$.

$\underline{I_{cAMP}}$ AND/OR $\underline{AM_{cAMP}}$

We have shown that cAMP mediates vaginal blood flow and by enhancing cAMP signalling we can enhance vaginal blood flow in an animal model. Thus, an agent that upregulates/enhances cAMP-mediated vasorelaxation will be efficacious in the treatment of FSAD. For ease of reference, we refer to these substances as $I_{cAMP}$ and/or an $AM_{cAMP}$. Here, the $I_{cAMP}$ and the $AM_{cAMP}$ have an adverse effect on cAMP levels or activity.

Thus, the agent may be any one of more of: an $I:I_{cAMP}$ and/or an $I:AM_{cAMP}$.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

Examples of $I_{cAMP}$ and the $AM_{cAMP}$ include one or more of PDE(s), NPY and NEP, or any component associated therewith. The associated component may be, for example, a receptor and/or a co-factor.

Thus, preferably the agent may be any one of more of: an I:PDE$_{cAMP}$, an I:NPY (sometimes written as NPYi), an I:NPY Y$_{n}$ (sometimes written as NPY Y$_{n}$I), and I:NEP.

Likewise, the agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

## I:I$_{cAMP}$ AND/OR I:AM$_{cAMP}$

In accordance with the present invention we have found that it is possible to treat and/or prevent FSAD by using an agent that reduces and/or eliminates and/or masks and/or diverts and/or prevents the detrimental effect of the I$_{cAMP}$ and/or the AM$_{cAMP}$ towards cAMP. The agent may even restore cAMP levels that were decreased by the a I$_{cAMP}$ and/or a AM$_{cAMP}$. For ease, we refer to these substances as I:I$_{cAMP}$ and/or a I:AM$_{cAMP}$. Here, the I:I$_{cAMP}$ and the I:AM$_{cAMP}$ prevent or reduce the adverse effect on cAMP levels or activity.

Thus, in one preferred aspect, the agent is an I:I$_{cAMP}$ and/or an I:AM$_{cAMP}$ wherein the AM$_{cAMP}$ has a detrimental effect on AM$_{cAMP}$.

In a preferred aspect, the agent may be one or more of:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$ (where n denotes an appropriate class or sub-class)
I:NPY
I:NPY Y$_{n}$ (where n denotes an appropriate class or sub-class)I:NEP

## A$_{cAMP}$

In accordance with the present invention, we have found that one of the important causes of FSAD is due to low levels or low activity of cAMP in the female genitalia.

Thus, the agent may be a U:A$_{cAMP}$.

Examples of A$_{cAMP}$ include VIP and AC, or any component associated therewith. The associated component may be, for example, a receptor and/or a co-factor.

Thus, preferably the agent may be any one of more of: A:AC, A:VIPr, A:VIP$_n$, I:I:VIPr or I:I:VIP$_n$.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

## U:A$_{cAMP}$

In another respect, preferably, the target is a component that increases the level of cAMP. Hence, the agent can be an U:AC

By way of example, the target could be cAMP itself or AC or VIP (or combinations thereof).

Hence, by way of example, the agent can be any one of : an U:A$_{cAMP}$, an A:AC, an A:VIPr, an A:VIP$_n$, an I:I:VIPr or an I:I:VIP$_n$.

## COMBINATION OF I:I$_{cAMP}$ AND/OR I:M$_{cAMP}$ AND/OR U:A$_{cAMP}$

In another aspect, the agent of the present invention may even be a combination of cAMP potentiators. By way of example, the agent of the present invention may be two or more of:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$.

## COMBINATION OF cAMP Mimetic and I:$I_{cAMP}$ AND/OR I:$M_{cAMP}$ AND/OR U:$A_{cAMP}$

In another aspect, the agent of the present invention may even be a combination of a cAMP mimetic and one or more cAMP potentiators. By way of example, the agent of the present invention may be a cAMP mimetic and one or more of:

I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$.

## INHIBITOR

The term "inhibitor" as used herein with respect to the agent of the present invention means an agent that can reduce and/or eliminate and/or mask and/or prevent the detrimental action of a $I_{cAMP}$ and/or a detrimental $M_{cAMP}$ towards cAMP. The inhibitor may act as an antagonist.

## ACTIVATOR

The term "activator" as used herein with respect to the agent of the present invention means an agent that can increase and/or produce and/or unmask and/or elevate and/or ensure action of cAMP and/or an $A_{cAMP}$. The activator may act as an agonist.

## OTHER ACTIVE COMPONENTS

In another aspect, the agent of the present invention may even be in combination with one or more other active components - such as one or more agents capable of potentiating cGMP.

## AMINO ACID SEQUENCE

As used herein, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "polypeptide" and/or the term "protein". In some instances, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "peptide". In some instances, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "protein".

The amino acid sequence may be prepared isolated from a suitable source, or it may be made synthetically or it may be prepared by use of recombinant DNA techniques.

In one aspect, the present invention provides an amino acid sequence that is capable of acting as a target in an assay for the identification of one or more agents and/or derivatives thereof capable of affecting the amino acid sequence in order to potentiate cAMP to treat FSAD.

## NUCLEOTIDE SEQUENCE

As used herein, the term "nucleotide sequence" is synonymous with the term "polynucleotide".

The nucleotide sequence may be DNA or RNA of genomic or synthetic or of recombinant origin. The nucleotide sequence may be double-stranded or single-stranded whether representing the sense or antisense strand or combinations thereof.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is DNA.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is prepared by use of recombinant DNA techniques (e.g. recombinant DNA).

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is cDNA.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence may be the same as the naturally occurring form for this aspect.

In one aspect, the present invention provides a nucleotide sequence encoding a substance capable of acting as a target in an assay (such as a yeast two hybrid assay) for the identification of one or more agents and/or derivatives thereof capable of affecting the substance in order to potentiate cAMP to treat FSAD.

It will be understood by a skilled person that numerous different nucleotide sequences can encode the targets of the present invention as a result of the degeneracy of the genetic code. In addition, it is to be understood that skilled persons may, using routine techniques, make nucleotide substitutions that do not substantially affect the activity encoded by the nucleotide sequence of the present invention to reflect the codon usage of any particular host organism in which the target of the present invention is to be expressed. Thus, the terms "variant", "homologue" or "derivative" in relation to the nucleotide sequence set out in the attached sequence listings include any substitution of, variation of, modification of, replacement of, deletion of or addition of one (or more) nucleic acid from or to the sequence providing the resultant nucleotide sequence encodes a functional target according the present invention (or even an agent according to the present invention if said agent comprises a nucleotide sequence or an amino acid sequence).

As indicated above, with respect to sequence homology, preferably there is at least 75%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90% homology to the sequences shown in the sequence listing herein. More preferably there is at least 95%, more preferably at least 98%, homology. Nucleotide homology comparisons may be conducted as described above. A preferred sequence comparison program is the GCG Wisconsin Bestfit program described above. The default scoring matrix has a match value of 10 for each identical nucleotide and -9 for each mismatch. The default gap creation penalty is -50 and the default gap extension penalty is -3 for each nucleotide.

The present invention also encompasses nucleotide sequences that are capable of hybridising selectively to the sequences presented herein, or any variant, fragment or derivative thereof, or to the complement of any of the above. Nucleotide sequences are preferably at least 15 nucleotides in length, more preferably at least 20, 30, 40 or 50 nucleotides in length. These sequences could be used a probes, such as in a diagnostic kit.

1041

## VARIANTS/HOMOLOGUES/DERIVATIVES

In addition to the specific amino acid sequences and nucleotide sequences mentioned herein, the present invention also encompasses the use of variants, homologue and derivatives thereof. Here, the term "homology" can be equated with "identity".

In the present context, an homologous sequence is taken to include an amino acid sequence which may be at least 75, 85 or 90% identical, preferably at least 95 or 98% identical. In particular, homology should typically be considered with respect to those regions of the sequence known to be essential for an activity. Although homology can also be considered in terms of similarity (i.e. amino acid residues having similar chemical properties/functions), in the context of the present invention it is preferred to express homology in terms of sequence identity.

Homology comparisons can be conducted by eye, or more usually, with the aid of readily available sequence comparison programs. These commercially available computer programs can calculate % homology between two or more sequences.

% homology may be calculated over contiguous sequences, i.e. one sequence is aligned with the other sequence and each amino acid in one sequence is directly compared with the corresponding amino acid in the other sequence, one residue at a time. This is called an "ungapped" alignment. Typically, such ungapped alignments are performed only over a relatively short number of residues.

Although this is a very simple and consistent method, it fails to take into consideration that, for example, in an otherwise identical pair of sequences, one insertion or deletion will cause the following amino acid residues to be put out of alignment, thus potentially resulting in a large reduction in % homology when a global alignment is performed. Consequently, most sequence comparison methods are designed to produce optimal alignments that take into consideration possible insertions and deletions without penalising unduly the overall homology score. This is achieved by inserting "gaps" in the sequence alignment to try to maximise local homology.

However, these more complex methods assign "gap penalties" to each gap that occurs in the alignment so that, for the same number of identical amino acids, a sequence alignment with as few gaps as possible - reflecting higher relatedness between the two compared sequences - will achieve a higher score than one with many gaps. "Affine gap costs" are typically used that charge a relatively high cost for the existence of a gap and a smaller penalty for each subsequent residue in the gap. This is the most commonly used gap scoring system. High gap penalties will of course produce optimised alignments with fewer gaps. Most alignment programs allow the gap penalties to be modified. However, it is preferred to use the default values when using such software for sequence comparisons. For example when using the GCG Wisconsin Bestfit package (see below) the default gap penalty for amino acid sequences is -12 for a gap and -4 for each extension.

Calculation of maximum % homology therefore firstly requires the production of an optimal alignment, taking into consideration gap penalties. A suitable computer program for carrying out such an alignment is the GCG Wisconsin Bestfit package (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Examples of other software than can perform sequence comparisons include, but are not limited to, the BLAST package (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* – Chapter 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 403-410) and the GENEWORKS suite of comparison tools. Both BLAST and FASTA are available for offline and online searching (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, pages 7-58 to 7-60). However it is preferred to use the GCG Bestfit program. A new tool, called BLAST 2 Sequences is also available for comparing protein and nucleotide sequence (see FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 and tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Although the final % homology can be measured in terms of identity, the alignment process itself is typically not based on an all-or-nothing pair comparison. Instead, a scaled similarity score matrix is generally used that assigns scores to each pairwise comparison based on chemical similarity or evolutionary distance. An example of such a matrix commonly used is the BLOSUM62 matrix - the default matrix for the BLAST suite of programs. GCG Wisconsin programs generally use either the public default values or a custom symbol comparison table if supplied (see user manual for further details). It is preferred to use the public default values for the GCG package, or in the case of other software, the default matrix, such as BLOSUM62.

Once the software has produced an optimal alignment, it is possible to calculate % homology, preferably % sequence identity. The software typically does this as part of the sequence comparison and generates a numerical result.

The sequences may also have deletions, insertions or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent substance. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues as long as the secondary binding activity of the substance is retained. For example, negatively charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine, valine, glycine, alanine, asparagine, glutamine, serine, threonine, phenylalanine, and tyrosine.

Conservative substitutions may be made, for example according to the Table below. Amino acids in the same block in the second column and preferably in the same line in the third column may be substituted for each other:

| | | |
|---|---|---|
| ALIPHATIC | Non-polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar - uncharged | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar - charged | D E |
| | | K R |
| AROMATIC | | H F W Y |

The present invention also encompasses homologous substitution (substitution and replacement are both used herein to mean the interchange of an existing amino acid residue, with an alternative residue) may occur i.e. like-for-like substitution such as basic for basic, acidic for acidic, polar for polar etc. Non-homologous substitution may also occur i.e. from one class of residue to another or alternatively involving the inclusion of unnatural amino acids such as ornithine (hereinafter referred to as Z), diaminobutyric acid ornithine (hereinafter referred to as B), norleucine ornithine (hereinafter referred to as O), pyriylalanine, thienylalanine, naphthylalanine and phenylglycine.

Replacements may also be made by unnatural amino acids include; alpha* and alpha-disubstituted* amino acids, N-alkyl amino acids*, lactic acid*, halide derivatives of natural amino acids such as trifluorotyrosine*, p-Cl-phenylalanine*, p-Br-phenylalanine*, p-I-phenylalanine*, L-allyl-glycine*, ß-alanine*, L-α-amino butyric acid*, L-γ-amino butyric acid*, L-α-amino isobutyric acid*, L-ε-amino caproic acid#, 7-amino heptanoic acid*, L-methionine sulfone#*, L-norleucine*, L-norvaline*, p-nitro-L-phenylalanine*, L-hydroxyproline#, L-thioproline*, methyl derivatives of phenylalanine (Phe) such as 4-methyl-Phe*, pentamethyl-Phe*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (methyl)*, L-Phe (4-isopropyl)*, L-Tic (1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxyl acid)*, L-diaminopropionic acid # and L-Phe (4-benzyl)*. The notation * has been utilised for the purpose of the discussion above (relating to homologous or non-homologous substitution), to indicate the hydrophobic nature of the derivative whereas # has been utilised to indicate the hydrophilic nature of the derivative, #* indicates amphipathic characteristics.

Variant amino acid sequences may include suitable spacer groups that may be inserted between any two amino acid residues of the sequence including alkyl groups such as methyl, ethyl or propyl groups in addition to amino acid spacers such as glycine or β-alanine residues. A further form of variation, involves the presence of one or more amino acid residues in peptoid form, will be well understood by those skilled in the art. For the avoidance of doubt, "the peptoid form" is used to refer to variant amino acid residues wherein the α-carbon substituent group is on the residue's nitrogen atom rather than the α-carbon. Processes for preparing peptides in the peptoid form are known in the art, for example Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 and Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

## HYBRIDISATION

The present invention also encompasses the use of sequences that can hybridise to the target sequences presented herein – such as if the agent is an anti-sense sequence.

The term "hybridization" as used herein shall include "the process by which a strand of nucleic acid joins with a complementary strand through base pairing" as well as the process of amplification as carried out in polymerase chain reaction (PCR) technologies.

Nucleotide sequences of the invention capable of selectively hybridising to the nucleotide sequences presented herein, or to their complement, will be generally at least 75%, preferably at least 85 or 90% and more preferably at least 95% or 98% homologous to the corresponding complementary nucleotide sequences presented herein over a region of at least 20, preferably at least 25 or 30, for instance at least 40, 60 or 100 or more contiguous nucleotides. Preferred nucleotide sequences of the invention will comprise regions homologous to the nucleotide sequence set out in SEQ ID No 2 of the sequence listings of the present invention preferably at least 80 or 90% and more preferably at least 95% homologous to the nucleotide sequence set out in SEQ ID No 2 of the sequence listings of the present invention.

The term "selectively hybridizable" means that the nucleotide sequence, when used as a probe, is used under conditions where a target nucleotide sequence of the invention is found to hybridize to the probe at a level significantly above background. The background hybridization may occur because of other nucleotide sequences present, for example, in the cDNA or genomic DNA library being screened. In this event, background implies a level of signal generated by interaction between the probe and a non-specific DNA member of the library which is less than 10 fold, preferably less than 100 fold as intense as the specific interaction observed with the target DNA. The intensity of interaction may be measured, for example, by radiolabelling the probe, e.g. with $^{32}P$.

Hybridization conditions are based on the melting temperature (Tm) of the nucleic acid binding complex, as taught in Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego CA), and confer a defined "stringency" as explained below.

Maximum stringency typically occurs at about Tm-5°C (5°C below the Tm of the probe); high stringency at about 5°C to 10°C below Tm; intermediate stringency at about 10°C to 20°C below Tm; and low stringency at about 20°C to 25°C below Tm. As will be understood by those of skill in the art, a maximum stringency hybridization can be used to identify or detect identical nucleotide sequences while an intermediate (or low) stringency hybridization can be used to identify or detect similar or related polynucleotide sequences.

In a preferred aspect, the present invention covers nucleotide sequences that can hybridise to the nucleotide sequence of the present invention under stringent conditions (e.g. 65°C and 0.1xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M $Na_3$ Citrate pH 7.0). Where the nucleotide sequence of the invention is double-stranded, both strands of the duplex, either individually or in combination, are encompassed by the present invention. Where the nucleotide sequence is single-stranded, it is to be understood that the complementary sequence of that nucleotide sequence is also included within the scope of the present invention.

Nucleotide sequences which are not 100% homologous to the sequences of the present invention but fall within the scope of the invention can be obtained in a number of ways. Other variants of the sequences described herein may be obtained for example by probing DNA libraries made from a range of sources. In addition, other viral/bacterial, or cellular homologues particularly cellular homologues found in mammalian cells (e.g. rat, mouse, bovine and primate cells), may be obtained and such homologues and fragments thereof in general will be capable of selectively hybridising to the sequences shown in the sequence listing herein. Such sequences may be obtained by probing cDNA libraries made from or genomic DNA libraries from other animal species, and probing such libraries with probes comprising all or part of the nucleotide sequence set out in herein under conditions of medium to high stringency. Similar considerations apply to obtaining species homologues and allelic variants of the amino acid and/or nucleotide sequences of the present invention.

Variants and strain/species homologues may also be obtained using degenerate PCR which will use primers designed to target sequences within the variants and homologues encoding conserved amino acid sequences within the sequences of the present invention. Conserved sequences can be predicted, for example, by aligning the amino acid sequences from several variants/homologues. Sequence alignments can be performed using computer software known in the art. For example the GCG Wisconsin PileUp program is widely used. The primers used in degenerate PCR will contain one or more degenerate positions and will be used at stringency conditions lower than those used for cloning sequences with single sequence primers against known sequences.

1044

Alternatively, such nucleotide sequences may be obtained by site directed mutagenesis of characterised sequences, such as the nucleotide sequence set out in SEQ ID No 2 of the sequence listings of the present invention. This may be useful where for example silent codon changes are required to sequences to optimise codon preferences for a particular host cell in which the nucleotide sequences are being expressed. Other sequence changes may be desired in order to introduce restriction enzyme recognition sites, or to alter the activity of the protein encoded by the nucleotide sequences.

The nucleotide sequences of the present invention may be used to produce a primer, e.g. a PCR primer, a primer for an alternative amplification reaction, a probe e.g. labelled with a revealing label by conventional means using radioactive or non-radioactive labels, or the nucleotide sequences may be cloned into vectors. Such primers, probes and other fragments will be at least 15, preferably at least 20, for example at least 25, 30 or 40 nucleotides in length, and are also encompassed by the term nucleotide sequence of the invention as used herein.

The nucleotide sequences such as a DNA polynucleotides and probes according to the invention may be produced recombinantly, synthetically, or by any means available to those of skill in the art. They may also be cloned by standard techniques.

In general, primers will be produced by synthetic means, involving a step wise manufacture of the desired nucleic acid sequence one nucleotide at a time. Techniques for accomplishing this using automated techniques are readily available in the art.

Longer nucleotide sequences will generally be produced using recombinant means, for example using a PCR (polymerase chain reaction) cloning techniques. This will involve making a pair of primers (e.g. of about 15 to 30 nucleotides) flanking a region of the targeting sequence which it is desired to clone, bringing the primers into contact with mRNA or cDNA obtained from an animal or human cell, performing a polymerase chain reaction (PCR) under conditions which bring about amplification of the desired region, isolating the amplified fragment (e.g. by purifying the reaction mixture on an agarose gel) and recovering the amplified DNA. The primers may be designed to contain suitable restriction enzyme recognition sites so that the amplified DNA can be cloned into a suitable cloning vector.

Due to the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences which encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid sequence, may be used to clone and express the target sequences. As will be understood by those of skill in the art, for certain expression systems, it may be advantageous to produce the target sequences with non-naturally occurring codons. Codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host (Murray E *et al* (1989) Nuc Acids Res 17:477-508) can be selected, for example, to increase the rate of the target expression or to produce recombinant RNA transcripts having desirable properties, such as a longer half-life, than transcripts produced from naturally occurring sequence.

## EXPRESSION VECTORS

The nucleotide sequence for use as the target or for expressing the target can be incorporated into a recombinant replicable vector. The vector may be used to replicate and express the nucleotide sequence in and/or from a compatible host cell. Expression may be controlled using control sequences which include promoters/enhancers and other expression regulation signals. Prokaryotic promoters and promoters functional in eukaryotic cells may be used. Tissue specific or stimuli specific promoters may be used. Chimeric promoters may also be used comprising sequence elements from two or more different promoters described above.

The protein produced by a host recombinant cell by expression of the nucleotide sequence may be secreted or may be contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. The coding sequences can be designed with signal sequences which direct secretion of the substance coding sequences through a particular prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

## FUSION PROTEINS

The target amino acid sequence may be produced as a fusion protein, for example to aid in extraction and purification. Examples of fusion protein partners include glutathione-S-transferase (GST), 6xHis, GAL4 (DNA binding and/or transcriptional activation domains) and β-galactosidase. It may also be convenient to include a proteolytic cleavage site between the fusion protein partner and the protein sequence

of interest to allow removal of fusion protein sequences. Preferably the fusion protein will not hinder the activity of the target.

The fusion protein may comprise an antigen or an antigenic determinant fused to the substance of the present invention. In this embodiment, the fusion protein may be a non-naturally occurring fusion protein comprising a substance which may act as an adjuvant in the sense of providing a generalised stimulation of the immune system. The antigen or antigenic determinant may be attached to either the amino or carboxy terminus of the substance.

In another embodiment of the invention, the amino acid sequence may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, for screening of peptide libraries for agents capable of affecting the substance activity, it may be useful to encode a chimeric substance expressing a heterologous epitope that is recognized by a commercially available antibody.

## ANTIBODIES

In one embodiment of the present invention, the agent of the present invention may be an antibody. In addition, or in the alternative, the target of the present invention may be an antibody.

Antibodies may be produced by standard techniques, such as by immunisation with the substance of the invention or by using a phage display library.

For the purposes of this invention, the term "antibody", unless specified to the contrary, includes but is not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, fragments produced by a Fab expression library, as well as mimetics thereof. Such fragments include fragments of whole antibodies which retain their binding activity for a target substance, Fv, F(ab') and F(ab')$_2$ fragments, as well as single chain antibodies (scFv), fusion proteins and other synthetic proteins which comprise the antigen-binding site of the antibody. Furthermore, the antibodies and fragments thereof may be humanised antibodies. Neutralizing antibodies, i.e., those which inhibit biological activity of the substance polypeptides, are especially preferred for diagnostics and therapeutics.

If polyclonal antibodies are desired, a selected mammal (e.g., mouse, rabbit, goat, horse, etc.) is immunised with an immunogenic polypeptide bearing a epitope(s) obtainable from an identified agent and/or substance of the present invention. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminium hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are potentially useful human adjuvants which may be employed if purified the substance polypeptide is administered to immunologically compromised individuals for the purpose of stimulating systemic defence.

Serum from the immunised animal is collected and treated according to known procedures. If serum containing polyclonal antibodies to an epitope obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention contains antibodies to other antigens, the polyclonal antibodies can be purified by immunoaffinity chromatography. Techniques for producing and processing polyclonal antisera are known in the art. In order that such antibodies may be made, the invention also provides polypeptides of the invention or fragments thereof haptenised to another polypeptide for use as immunogens in animals or humans.

Monoclonal antibodies directed against epitopes obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention can also be readily produced by one skilled in the art. The general methodology for making monoclonal antibodies by hybridomas is well known. Immortal antibody-producing cell lines can be created by cell fusion, and also by other techniques such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. Panels of monoclonal antibodies produced against orbit epitopes can be screened for various properties; i.e., for isotype and epitope affinity.

Monoclonal antibodies to the substance and/or identified agent of the present invention may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique originally described by Koehler and Milstein (1975 Nature 256:495-497), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor *et al* (1983) Immunol Today 4:72; Cote *et al* (1983) Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030) and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al* (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer

Therapy, Alan R Liss Inc, pp 77-96). In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (Morrison *et al* (1984) Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855; Neuberger *et al* (1984) Nature 312:604-608; Takeda *et al* (1985) Nature 314:452-454). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (US Patent No. 4,946,779) can be adapted to produce the substance specific single chain antibodies.

Antibodies, both monoclonal and polyclonal, which are directed against epitopes obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention are particularly useful in diagnosis, and those which are neutralising are useful in passive immunotherapy. Monoclonal antibodies, in particular, may be used to raise anti-idiotype antibodies. Anti-idiotype antibodies are immunoglobulins which carry an "internal image" of the substance and/or agent against which protection is desired. Techniques for raising anti-idiotype antibodies are known in the art. These anti-idiotype antibodies may also be useful in therapy.

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in Orlandi *et al* (1989, Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837), and Winter G and Milstein C (1991; Nature 349:293-299).

Antibody fragments which contain specific binding sites for the substance may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, the $F(ab')_2$ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the $F(ab')_2$ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (Huse WD *et al* (1989) Science 256:1275-128 1).

## REPORTERS

A wide variety of reporters may be used in the assay methods (as well as screens) of the present invention with preferred reporters providing conveniently detectable signals (eg. by spectroscopy). By way of example, a reporter gene may encode an enzyme which catalyses a reaction which alters light absorption properties.

Examples of reporter molecules include but are not limited to β-galactosidase, invertase, green fluorescent protein, luciferase, chloramphenicol, acetyltransferase, β-glucuronidase, exo-glucanase and glucoamylase. Alternatively, radiolabelled or fluorescent tag-labelled nucleotides can be incorporated into nascent transcripts which are then identified when bound to oligonucleotide probes.

In one preferred embodiment, the production of the reporter molecule is measured by the enzymatic activity of the reporter gene product, such as β-galactosidase.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of the target, such as by using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the protein, are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA) and fluorescent activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilising monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on PDE polypeptides is preferred, but a competitive binding assay may be employed. These and other assays are described, among other places, in Hampton R *et al* (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul MN) and Maddox DE *et al* (1983, J Exp Med 15 8:121 1).

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic and amino acid assays. Means for producing labelled hybridisation or PCR probes for detecting the target polynucleotide sequences include oligolabelling, nick translation, end-labelling or PCR amplification using a labelled nucleotide. Alternatively, the PDE coding sequence, or any portion of it, may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3 or SP6 and labelled nucleotides.

A number of companies such as Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI), and US Biochemical Corp (Cleveland, OH) supply commercial kits and protocols for these procedures. Suitable reporter molecules or labels include those radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles and the like. Patents teaching the use of such labels include US-A-3817837; US-A-3850752; US-

A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 and US-A-4366241. Also, recombinant immunoglobulins may be produced as shown in US-A-4816567.

Additional methods to quantify the expression of a particular molecule include radiolabeling (Melby PC *et al* 1993 J Immunol Methods 159:235-44) or biotinylating (Duplaa C *et al* 1993 Anal Biochem 229-36) nucleotides, coamplification of a control nucleic acid, and standard curves onto which the experimental results are interpolated. Quantification of multiple samples may be speeded up by running the assay in an ELISA format where the oligomer of interest is presented in various dilutions and a spectrophotometric or calorimetric response gives rapid quantification.

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, its presence and expression should be confirmed. For example, if the nucleotide sequence is inserted within a marker gene sequence, recombinant cells containing the same may be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a target coding sequence under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the target as well.

Alternatively, host cells which contain the coding sequence for the target and express the target coding regions may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridisation arid protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane-based, solution-based, or chip-based technologies for the detection and/or quantification of the nucleic acid or protein.

## GENERAL ASSAYS FOR cAMP ACTIVITY/LEVELS

The ability of a test agent to potentiate cAMP may be determined by measuring a relevant increase or decrease of a target level. In addition, or in the alternative, the ability of a test agent to potentiate cAMP may be determined by measuring a relevant increase in cAMP levels. By way of example, one may adapt the teachings of Smith *et al* 1993 (Appl. Biochem. Biotechnol. 41:189-218). There are also commercially available immunoassay kits for the measurement of cAMP (eg Amersham International, Arlington Heights, IL and DuPont, Boston, MA). Details on a suitable cAMP assay are provided in the Experimental Section.

## SCREENS

Any one or more of appropriate targets - such as an amino acid sequence and/or nucleotide sequence - may be used for identifying a $P_{cAMP}$ in any of a variety of drug screening techniques. The target employed in such a test may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The target may even be within an animal model, wherein said target may be an exogenous target or an introduced target. The animal model will be a non-human animal model. The abolition of target activity or the formation of binding complexes between the target and the agent being tested may be measured.

Techniques for drug screening may be based on the method described in Geysen, European Patent Application 84/03564, published on September 13, 1984. In summary, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with a suitable target or fragment thereof and washed. Bound entities are then detected - such as by appropriately adapting methods well known in the art. A purified target can also be coated directly onto plates for use in a drug screening techniques. Alternatively, non-neutralising antibodies can be used to capture the peptide and immobilise it on a solid support.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralising antibodies capable of binding a target specifically compete with a test compound for binding to a target.

Another technique for screening provides for high throughput screening (HTS) of agents having suitable binding affinity to the substances and is based upon the method described in detail in WO 84/03564.

It is expected that the assay methods of the present invention will be suitable for both small and large-scale screening of test compounds as well as in quantitative assays.

Thus, the present invention also relates to a method of identifying agents that potentiate cAMP, the method comprising contacting a suitable target with the agent and then measuring the activity and/or levels of cAMP.

The present invention also relates to a method of identifying agents that selectively potentiate cAMP in female sexual genitalia, the method comprising contacting a suitable target from female sexual genitalia and then measuring the activity and/or levels of cAMP.

The present invention also relates to a method of identifying agents that potentiate cAMP, the method comprising contacting a suitable target with the agent and then measuring the activity and/or levels of the target.

The present invention also relates to a method of identifying agents that selectively potentiate cAMP in female sexual genitalia, the method comprising contacting a suitable target from female sexual genitalia and then measuring the activity and/or levels of the target.

In a preferred aspect, the screen of the present invention comprises at least the following steps (which need not be in this same consecutive order): (a) conducting an *in vitro* screen to determine whether a candidate agent has the relevant activity (such as modulation of PDEII and/or NEP, such as NEP from dog kidney); (b) conducting one or more selectivity screens to determine the selectivity of said candidate agent (e.g. to see if said agent is also an ACE inhibitor); and (c) conducting an *in vivo* screen with said candidate agent (e.g. using a functional animal model). Typically, if said candidate agent passes screen (a) and screen (b) then screen (c) is performed.

## DIAGNOSTICS

The present invention also provides a diagnostic composition or kit for the detection of a pre-disposition for FSAD. In this respect, the composition or kit will comprise an entity that is capable of indicating the presence of one or more - or even the absence of one or more - of the targets in a test sample. Preferably, the test sample is obtained from the female sexual genitalia or a secretion thereof or therefrom.

By way of example, the diagnostic composition may comprise any one of the nucleotide sequences mentioned herein or a variant, homologue, fragment or derivative thereof, or a sequence capable of hybridising to all or part of any one of the nucleotide sequence.

In order to provide a basis for the diagnosis of disease, normal or standard values from a target should be established. This may be accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with an antibody to a target under conditions suitable for complex formation which are well known in the art. The amount of standard complex formation may be quantified by comparing it to a dilution series of positive controls where a known amount of antibody is combined with known concentrations of a purified target. Then, standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from subjects potentially affected by FSAD. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state.

A target itself, or any part thereof, may provide the basis for a diagnostic and/or a therapeutic compound. For diagnostic purposes, target polynucleotide sequences may be used to detect and quantify gene expression in conditions, disorders or diseases in which FSAD may be implicated.

The target encoding polynucleotide sequence may be used for the diagnosis of FSAD resulting from expression of the target. For example, polynucleotide sequences encoding a target may be used in hybridisation or PCR assays of tissues from biopsies or autopsies or biological fluids, to detect abnormalities in target expression. The form of such qualitative or quantitative methods may include Southern or northern analysis, dot blot or other membrane-based technologies; PCR technologies; dip stick, pin or chip technologies; and ELISA or other multiple sample formal technologies. All of these techniques are well known in the art and are in fact the basis of many commercially available diagnostic kits.

Such assays may be tailored to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regime and may be used in animal studies, in clinical trials, or in monitoring the treatment of an individual patient. In order to provide a basis for the diagnosis of disease, a normal or standard profile for target expression should be established. This is accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with the target or a portion thereof, under conditions suitable for hybridisation or amplification. Standard hybridisation may be quantified by comparing the values obtained for normal subjects with a dilution series of positive controls run in the same experiment where a known amount of purified target is used. Standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from subjects potentially affected by a disorder or disease related to expression of the target coding sequence. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state. If disease is established, an existing therapeutic agent is administered, and treatment profile or values may be generated. Finally, the assay may be repeated on a regular basis to evaluate whether the values progress toward or return to the normal or standard pattern. Successive treatment profiles may be used to show the efficacy of treatment over a period of several days or several months.

Thus, in one aspect, the present invention relates to the use of a target polypeptide, or variant, homologue, fragment or derivative thereof, to produce anti-target antibodies which can, for example, be used diagnostically to detect and quantify target levels in an FSAD states.

The present invention further provides diagnostic assays and kits for the detection of a target in cells and tissues comprising a purified target which may be used as a positive control, and anti-target antibodies. Such antibodies may be used in solution-based, membrane-based, or tissue-based technologies to detect any disease state or condition related to the expression of target protein or expression of deletions or a variant, homologue, fragment or derivative thereof.

## ASSAY METHODS

The diagnostic compositions and/or methods and/or kits may be used in the following techniques which include but are not limited to; competitive and non-competitive assays, radioimmunoassay, bioluminescence and chemiluminescence assays, fluorometric assays, sandwich assays, immunoradiometric assays, dot blots, enzyme linked assays including ELISA, microtiter plates, antibody coated strips or dipsticks for rapid monitoring of urine or blood, immunohistochemistry and immunocytochemistry.

By way of example, an immunohistochemistry kit may also be used for localization of NEP, PDE or NPY activity in genital tissue. This immunohistochemistry kit permits localization of NEP, PDE or NPY in tissue sections and cultured cells using both light and electron microscopy which may be used for both research and clinical purposes. Such information may be useful for diagnostic and possibly therapeutic purposes in the detection and/or prevention and/or treatment of a FSD, such as FSAD. For each kit the range, sensitivity, precision, reliability, specificity and reproducibility of the assay are established. Intraassay and interassay variation is established at 20%, 50% and 80% points on the standard curves of displacement or activity.

PROBES

Another aspect of the subject invention is the provision of nucleic acid hybridisation or PCR probes which are capable of detecting (especially those that are capable of selectively selecting) polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding a target coding region or closely related molecules, such as alleles. The specificity of the probe, i.e., whether it is derived from a highly conserved, conserved or non-conserved region or domain, and the stringency of the hybridisation or amplification (high, intermediate or low) will determine whether the probe identifies only naturally occurring target coding sequence, or related sequences. Probes for the detection of related nucleic acid sequences are selected from conserved or highly conserved nucleotide regions of target family members and such probes may be used in a pool of degenerate probes. For the detection of identical nucleic acid sequences, or where maximum specificity is desired, nucleic acid probes are selected from the non-conserved nucleotide regions or unique regions of the target polynucleotides. As used herein, the term "non-conserved nucleotide region" refers to a nucleotide region that is unique to a target coding sequence disclosed herein and does not occur in related family members.

PCR as described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188 provides additional uses for oligonucleotides based upon target sequences. Such oligomers are generally chemically synthesized, but they may be generated enzymatically or produced from a recombinant source. Oligomers generally comprise two nucleotide sequences, one with sense orientation (5'->3') and one with antisense (3'<-5') employed under optimised conditions for identification of a specific gene or condition. The same two oligomers, nested sets of oligomers, or even a degenerate pool of oligomers may be employed under less stringent conditions for detection and/or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

The nucleic acid sequence for a target can also be used to generate hybridisation probes as previously described, for mapping the endogenous genomic sequence. The sequence may be mapped to a particular chromosome or to a specific region of the chromosome using well known techniques. These include *in situ* hybridisation to chromosomal spreads (Verma *et al* (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic

1050

Techniques, Pergamon Press, New York City), flow-sorted chromosomal preparations, or artificial chromosome constructions such as YACs, bacterial artificial chromosomes (BACs), bacterial PI constructions or single chromosome cDNA libraries.

*In situ* hybridisation of chromosomal preparations and physical mapping techniques such as linkage analysis using established chromosomal markers are invaluable in extending genetic maps. Examples of genetic maps can be found in Science (1995; 270:410f and 1994; 265:1981f). Often the placement of a gene on the chromosome of another mammalian species may reveal associated markers even if the number or arm of a particular human chromosome is not known. New sequences can be assigned to chromosomal arms, or parts thereof, by physical mapping. This provides valuable information to investigators searching for disease genes using positional cloning or other gene discovery techniques. Once a disease or syndrome has been crudely localised by genetic linkage to a particular genomic region any sequences mapping to that area may represent associated or regulatory genes for further investigation. The nucleotide sequence of the subject invention may also be used to detect differences in the chromosomal location due to translocation, inversion, etc. between normal, carrier or affected individuals.

## HOST CELLS

The term "host cell" - in relation to the present invention includes any cell that could comprise the target for the agent of the present invention.

Thus, a further embodiment of the present invention provides host cells transformed or transfected with a polynucleotide that is or expresses the target of the present invention. Preferably said polynucleotide is carried in a vector for the replication and expression of polynucleotides that are to be the target or are to express the target. The cells will be chosen to be compatible with the said vector and may for example be prokaryotic (for example bacterial), fungal, yeast or plant cells.

The gram-negative bacterium *E. coli* is widely used as a host for heterologous gene expression. However, large amounts of heterologous protein tend to accumulate inside the cell. Subsequent purification of the desired protein from the bulk of *E.coli* intracellular proteins can sometimes be difficult.

In contrast to *E.coli*, bacteria from the genus *Bacillus* are very suitable as heterologous hosts because of their capability to secrete proteins into the culture medium. Other bacteria suitable as hosts are those from the genera *Streptomyces* and *Pseudomonas*.

Depending on the nature of the polynucleotide encoding the polypeptide of the present invention, and/or the desirability for further processing of the expressed protein, eukaryotic hosts such as yeasts or other fungi may be preferred. In general, yeast cells are preferred over fungal cells because they are easier to manipulate. However, some proteins are either poorly secreted from the yeast cell, or in some cases are not processed properly (e.g. hyperglycosylation in yeast). In these instances, a different fungal host organism should be selected.

Examples of suitable expression hosts within the scope of the present invention are fungi such as *Aspergillus* species (such as those described in EP-A-0184438 and EP-A-0284603) and *Trichoderma* species; bacteria such as *Bacillus* species (such as those described in EP-A-0134048 and EP-A-0253455), *Streptomyces* species and *Pseudomonas* species; and yeasts such as *Kluyveromyces* species (such as those described in EP-A-0096430 and EP-A-0301670) and *Saccharomyces* species. By way of example, typical expression hosts may be selected from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger var. tubigenis*, *Aspergillus niger var. awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus orvzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*.

The use of suitable host cells - such as yeast, fungal and plant host cells - may provide for post-translational modifications (e.g. myristoylation, glycosylation, truncation, lapidation and tyrosine, serine or threonine phosphorylation) as may be needed to confer optimal biological activity on recombinant expression products of the present invention.

ORGANISM

The term "organism" in relation to the present invention includes any organism that could comprise the target according to the present invention and/or products obtained therefrom. Examples of organisms may include a fungus, yeast or a plant.

1051

The term "transgenic organism" in relation to the present invention includes any organism that comprises the target according to the present invention and/or products obtained.

## TRANSFORMATION OF HOST CELLS/HOST ORGANISMS

As indicated earlier, the host organism can be a prokaryotic or a eukaryotic organism. Examples of suitable prokaryotic hosts include *E. coli* and *Bacillus subtilis*. Teachings on the transformation of prokaryotic hosts is well documented in the art, for example see Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) and Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

If a prokaryotic host is used then the nucleotide sequence may need to be suitably modified before transformation - such as by removal of introns.

In another embodiment the transgenic organism can be a yeast. In this regard, yeast have also been widely used as a vehicle for heterologous gene expression. The species *Saccharomyces cerevisiae* has a long history of industrial use, including its use for heterologous gene expression. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* has been reviewed by Goodey et al (1987, Yeast Biotechnology, D R Berry et al, eds, pp 401-429, Allen and Unwin, London) and by King et al (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E F Walton and G T Yarronton, eds, pp 107-133, Blackie, Glasgow).

For several reasons *Saccharomyces cerevisiae* is well suited for heterologous gene expression. First, it is non-pathogenic to humans and it is incapable of producing certain endotoxins. Second, it has a long history of safe use following centuries of commercial exploitation for various purposes. This has led to wide public acceptability. Third, the extensive commercial use and research devoted to the organism has resulted in a wealth of knowledge about the genetics and physiology as well as large-scale fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*.

A review of the principles of heterologous gene expression in Saccharomyces cerevisiae and secretion of gene products is given by E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", Yeasts, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.).

Several types of yeast vectors are available, including integrative vectors, which require recombination with the host genome for their maintenance, and autonomously replicating plasmid vectors.

In order to prepare the transgenic Saccharomyces, expression constructs are prepared by inserting the nucleotide sequence of the present invention into a construct designed for expression in yeast. Several types of constructs used for heterologous expression have been developed. The constructs contain a promoter active in yeast fused to the nucleotide sequence of the present invention, usually a promoter of yeast origin, such as the GAL1 promoter, is used. Usually a signal sequence of yeast origin, such as the sequence encoding the SUC2 signal peptide, is used. A terminator active in yeast ends the expression system.

For the transformation of yeast several transformation protocols have been developed. For example, a transgenic Saccharomyces according to the present invention can be prepared by following the teachings of Hinnen et al (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929); Beggs, J D (1978, Nature, London, 275, 104); and Ito, H et al (1983, J Bacteriology 153, 163-168).

The transformed yeast cells are selected using various selective markers. Among the markers used for transformation are a number of auxotrophic markers such as LEU2, HIS4 and TRP1, and dominant antibiotic resistance markers such as aminoglycoside antibiotic markers, eg G418.

Another host organism is a plant. The basic principle in the construction of genetically modified plants is to insert genetic information in the plant genome so as to obtain a stable maintenance of the inserted genetic material. Several techniques exist for inserting the genetic information, the two main principles being direct introduction of the genetic information and introduction of the genetic information by use of a vector system. A review of the general techniques may be found in articles by Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) and Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994 17-27). Further teachings on plant transformation may be found in EP-A-0449375.

Thus, the present invention also provides a method of transforming a host cell with a nucleotide sequence that is to be the target or is to express the target. Host cells transformed with the nucleotide sequence may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the encoded protein from cell culture. The protein produced by a recombinant cell may be secreted or may be contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing coding sequences can be designed with signal sequences which direct secretion of the coding sequences through a particular prokaryotic or eukaryotic cell membrane. Other recombinant constructions may join the coding sequence to nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins (Kroll *DJ et al* (1993) DNA Cell Biol 12:441-53).

## PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising administering a therapeutically effective amount of the agent of the present invention and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipients (including combinations thereof).

The pharmaceutical compositions may be for human or animal usage in human and veterinary medicine and will typically comprise any one or more of a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, or excipient. Acceptable carriers or diluents for therapeutic use are well known in the pharmaceutical art, and are described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). The choice of pharmaceutical carrier, excipient or diluent can be selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice. The pharmaceutical compositions may comprise as - or in addition to - the carrier, excipient or diluent any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s), solubilising agent(s).

Preservatives, stabilizers, dyes and even flavoring agents may be provided in the pharmaceutical composition. Examples of preservatives include sodium benzoate, sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid. Antioxidants and suspending agents may be also used.

There may be different composition/formulation requirements dependent on the different delivery systems. By way of example, the pharmaceutical composition of the present invention may be formulated to be delivered using a mini-pump or by a mucosal route, for example, as a nasal spray or aerosol for inhalation or ingestable solution, or parenterally in which the composition is formulated by an injectable form, for delivery, by, for example, an intravenous, intramuscular or subcutaneous route. Alternatively, the formulation may be designed to be delivered by both routes.

Where the agent is to be delivered mucosally through the gastrointestinal mucosa, it should be able to remain stable during transit though the gastrointestinal tract; for example, it should be resistant to proteolytic degradation, stable at acid pH and resistant to the detergent effects of bile.

Where appropriate, the pharmaceutical compositions can be administered by inhalation, in the form of a suppository or pessary, topically in the form of a lotion, solution, cream, ointment or dusting powder, by use of a skin patch, orally in the form of tablets containing excipients such as starch or lactose, or in capsules or ovules either alone or in admixture with excipients, or in the form of elixirs, solutions or suspensions containing flavouring or colouring agents, or they can be injected parenterally, for example intravenously, intramuscularly or subcutaneously. For parenteral administration, the compositions may be best used in the form of a sterile aqueous solution which may contain other substances, for example enough salts or monosaccharides to make the solution isotonic with blood. For buccal or sublingual administration the compositions may be administered in the form of tablets or lozenges which can be formulated in a conventional manner.

Preferably, the agent is in a form that is suitable for oral delivery.

For some embodiments, preferably the agent - when in use - does not act on the central nervous system.

For some embodiments, preferably the agent - when in use - is peripherally acting.

## ADMINISTRATION

Typically, a physician will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual subject and it will vary with the age, weight and response of the particular patient. The dosages below are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited.

The compositions of the present invention may be administered by direct injection. The composition may be formulated for parenteral, mucosal, intramuscular, intravenous, subcutaneous, intraocular or transdermal administration. Depending upon the need, the agent may be administered at a dose of from 0.01 to 30 mg/kg body weight, such as from 0.1 to 10 mg/kg, more preferably from 0.1 to 1 mg/kg body weight.

The term "administered" includes delivery by viral or non-viral techniques. Viral delivery mechanisms include but are not limited to adenoviral vectors, adeno-associated viral (AAV) vectos, herpes viral vectors, retroviral vectors, lentiviral vectors, and baculoviral vectors. Non-viral delivery mechanisms include lipid mediated transfection, liposomes, immunoliposomes, lipofectin, cationic facial amphiphiles (CFAs) and combinations thereof. The routes for such delivery mechanisms include but are not limited to mucosal, nasal, oral, parenteral, gastrointestinal, topical, or sublingual routes.

In addition or in the alternative the compositions (or component parts thereof) of the present invention may be administered by direct injection. In addition or in the alternative the compositions (or component parts thereof) of the present invention may be administered topically. In addition or in the alternative the compositions (or component parts thereof) of the present invention may be administered by inhalation. In addition or in the alternative the compositions (or component parts thereof) of the present invention may also be administered by one or more of: a mucosal route, for example, as a nasal spray or aerosol for inhalation or as an ingestable solution such as by an oral route, or by a parenteral route where delivery is by an injectable form, such as, for example, by a rectal, ophthalmic (including intravitreal or intracameral), nasal, topical (including buccal and sublingual), intrauterine, vaginal or parenteral (including subcutaneous, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, intradermal; intracranial, intratracheal, and epidural) transdermal, intraperitoneal, intracranial, intracerebroventricular, intracerebral, intravaginal, intrauterine, or parenteral (e.g., intravenous, intraspinal, subcutaneous, transdermal or intramuscular) route.

By way of further example, the pharmaceutical composition of the present invention may be administered in accordance with a regimen of 1 to 10 times per day, such as once or twice per day. The specific dose level and frequency of dosage for any particular patient may be varied and will depend upon a variety of factors including the activity of the specific compound employed, the metabolic stability and length of action of that compound, the age, body weight, general health, sex, diet, mode and time of administration, rate of excretion, drug combination, the severity of the particular condition, and the individual undergoing therapy.

Hence, the term "administered" includes but is not limited to delivery by a mucosal route, for example, as a nasal spray or aerosol for inhalation or as an ingestable solution; a parenteral route where delivery is by an injectable form, such as, for example, an intravenous, intramuscular or subcutaneous route.

For some applications, preferably the agent is administered orally.

For some applications, preferably the agent is administered topically.

The agents of the present invention may be administered alone but will generally be administered in admixture with a suitable pharmaceutical excipient, diluent or carrier selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice.

For example, the agent can be administered orally, buccally or sublingually in the form of tablets, capsules, ovules, elixirs, solutions or suspensions, which may contain flavouring or colouring agents, for immediate-, delayed-, modified-, sustained-, pulsed- or controlled-release applications.

The tablets may contain excipients such as microcrystalline cellulose, lactose, sodium citrate, calcium carbonate, dibasic calcium phosphate and glycine, disintegrants such as starch (preferably corn, potato or tapioca starch), sodium starch glycollate, croscarmellose sodium and certain complex silicates, and granulation binders such as polyvinylpyrrolidone, hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), hydroxypropylcellulose (HPC), sucrose, gelatin and acacia. Additionally, lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, glyceryl behenate and talc may be included.

Solid compositions of a similar type may also be employed as fillers in gelatin capsules. Preferred excipients in this regard include lactose, starch, a cellulose, milk sugar or high molecular weight polyethylene glycols. For aqueous suspensions and/or elixirs, the agent may be combined with various sweetening or flavouring agents, colouring matter or dyes, with emulsifying and/or suspending agents and with diluents such as water, ethanol, propylene glycol and glycerin, and combinations thereof.

As indicated, the agent can be administered parenterally, for example, intravenously, intra-arterially, intraperitoneally, intrathecally, intraventricularly, intraurethrally, intrasternally, intracranially, intramuscularly or subcutaneously, or it may be administered by infusion techniques. For such parenteral administration it is best used in the form of a sterile aqueous solution which may contain other substances, for example, enough salts or glucose to make the solution isotonic with blood. The aqueous solutions should be suitably buffered (preferably to a pH of from 3 to 9), if necessary. The preparation of suitable parenteral formulations under sterile conditions is readily accomplished by standard pharmaceutical techniques well-known to those skilled in the art.

For oral and parenteral administration to human patients, the daily dosage level of the agent may be in single or divided doses.

Thus tablets or capsules of the agent may contain suitable amounts of the active compound for administration singly or two or more at a time, as appropriate. The physician in any event will determine the actual dosage which will be most suitable for any individual patient and it will vary with the age, weight and response of the particular patient. The above dosages are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited and such are within the scope of this invention. The skilled person will appreciate that, in the treatment of certain conditions the agent may be taken as a single dose as needed or desired.

As indicated, the agent of the present invention can be administered intranasally or by inhalation and are conveniently delivered in the form of a dry powder inhaler or an aerosol spray presentation from a pressurised container, pump, spray or nebuliser with the use of a suitable propellant, e.g. dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, a hydrofluoroalkane such as 1,1,1,2-tetrafluoroethane (HFA 134A [trade mark]) or 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropane (HFA 227EA [trade mark]), carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurised aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. The pressurised container, pump, spray or nebuliser may contain a solution or suspension of the active compound, e.g. using a mixture of ethanol and the propellant as the solvent, which may additionally contain a lubricant, e.g. sorbitan trioleate. Capsules and cartridges (made, for example, from gelatin) for use in an inhaler or insufflator may be formulated to contain a powder mix of the agent and a suitable powder base such as lactose or starch.

Alternatively, the agent of the present invention can be administered in the form of a suppository or pessary, or it may be applied topically in the form of a gel, hydrogel, lotion, solution, cream, ointment or dusting powder. The agent of the present invention may also be dermally or transdermally administered, for example, by the use of a skin patch. They may also be administered by the pulmonary or rectal routes. They may also be administered by the ocular route. For ophthalmic use, the compounds can be formulated as micronised suspensions in isotonic, pH adjusted, sterile saline, or, preferably, as solutions in isotonic, pH adjusted, sterile saline, optionally in combination with a preservative such as a benzylalkonium chloride. Alternatively, they may be formulated in an ointment such as petrolatum.

For application topically to the skin, the agent of the present invention can be formulated as a suitable ointment containing the active compound suspended or dissolved in, for example, a mixture with one or more of the following: mineral oil, liquid petrolatum, white petrolatum, propylene glycol, polyoxyethylene polyoxypropylene compound, emulsifying wax and water. Alternatively, it can be formulated as a suitable lotion or cream, suspended or dissolved in, for example, a mixture of one or more of the following: mineral oil, sorbitan monostearate, a polyethylene glycol, liquid paraffin, polysorbate 60, cetyl esters wax, cetearyl alcohol, 2-octyldodecanol, benzyl alcohol and water.

## ANIMAL TEST MODELS

*In vivo* models may be used to investigate and/or design therapies or therapeutic agents to treat FSAD. The models could be used to investigate the effect of various tools/lead compounds on a variety of paramaters which indicate the sexual arousal response. These animal test models can be used as, or in, the assay of the present invention. The animal test model will be a non-human animal test model.

There are a number of animal models for vasculogenic female sexual dysfunction (FSAD) available that could be used.

By way of example, reference may be made to invasive animal models (e.g. see Park *et al.*, 1997). Here, vaginal and clitoral haemodynamic responses can be directly recorded following pelvic nerve stimulation in normal and atherosclerotic female rabbits (a validated model of FSAD). The *in vivo* effects of cAMP potentiators - such as vasodilatory agents such as NPY antagonist or VIP agonists - can be investigated either in normal or FSAD animals.

By way of further example, reference may be made to non-invasive animal models (e.g. see the review of Goldstein *et al.*, 1998; Laan *et al.*, 1998). Here, pulsed wave Doppler ultrasonography provides a means of detecting blood flow changes in the vaginal and clitoral arteries. This model can be used to investigate vasculogenic effects during pharmacological administration of vasodilators.

Other non-invasive techniques that can be used include vaginal photoplethysmography, which provides a quantitative measure of vaginal mucosa engorgement, and vaginal thermal clearance techniques, which are based on the principle that vaginal blood flow changes can be recorded by measuring the heat transfer away from an intravaginal probe kept at a constant temperature.

In a preferred aspect, a non-invasive model of FSAD is used.

## AN ANIMAL MODEL OF SEXUAL AROUSAL

In our studies we have developed a robust reproducible model of the physiology of sexual arousal. This model uses an anaesthetised rabbit and employs Laser Doppler technologies to monitor genital blood flow whilst routinely recording cardiovascular parameters. We are capable of measuring small changes in vaginal blood flow induced by pelvic nerve stimulation or infusion of VIP in the absence and presence of test agents.

We believe that our animal model directly reflects the clinical data. Hence, this model can be used to study candidate agents for the treatment of FSAD, such as measuring enhancement of vaginal blood flow.

## PHYSIOLOGICAL MEASUREMENT OF FEMALE SEXUAL AROUSAL

In accordance with the present invention, a number of different techniques may be used for measuring clitoral and vaginal blood flow. By way of example, use may be made of vaginal photoplethysmography, vaginal heat washout technique, clitoral and vaginal contrast-enhanced MRI, clitoral/vulval laser Doppler pulsed imaging, and clitoral ultrasonography.

Quantification of vaginal lubrication may also be measured by techniques known in the art - such as (a) pre- and post-stimulation weighing of vaginal tampons, and (b) measuring the pH of vaginal fluid. With respect to the latter aspect, the normal resting acid medium in the vagina becomes more alkaline as it approaches blood pH when transudation of fluid occurs during sexual stimulation.

## PDE (phosphodiesterase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is a PDE (phosphodiesterase).

It is known that cyclic nucleotides, such as cAMP and cGMP, are important intracellular second messengers. Cyclic nucleotide phosphodiesterases - otherwise known as PDEs - are a family of enzymes that catalyse the degradation of cyclic nucleotides and, in doing so, are one of the cellular components that regulate the concentration of cyclic nucleotides.

In recent years, at least seven PDE enzymes (such as PDEI - PDEVII), as well as many subtypes of these enzymes, have been defined based on substrate affinity and cofactor requirements (Beavo JA and Reifsnyder DH, Trends Pharmacol. Sci. 11:150 [1990]; Beavo J, In: Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action., Beavo J and Housley MD (Eds.). Wiley:Chichester, pp. 3-15 [1990]).

Examples of PDEs include: PDEI which is a $Ca^{2+}$/Calmodulin-dependent PDE; PDEII which is a cAMP and cGMP stimulated PDE; PDEIII which is a cGMP inhibited PDE; PDEIV which is a high affinity cAMP-specific PDE; and PDEV which is a cGMP specific PDE. PDEI etc. are sometimes called PDE type I etc. or PDE type 1 etc.

1056

Each PDE family may contain two or more isoforms (i.e. there may be two or more PDE isoenzymes). By way of example, mammalian PDE IV, the homologue of the *Drosophila* Dunce gene (Chen CN *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 83:9313 [1986]), is known to have four isoforms in the rat (Swinnen JV *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 86:5325 [1989]). Human PDEs are also known to occur as isoforms and have splice variants. For example, the cloning of one human isoform of PDEIV from monocytes was reported in 1990 (Livi GP *et al.*, Mol. Cell. Bio., 10:2678 [1990]). By way of further example, other workers have independently cloned three splice variants of PDEIV, which are now designated hPDEIV-B1, hPDEIV-B2, and hPDEIV-B3.

Teachings on cyclic nucleotide phosphodiesterases can also be found in US-A-5932423 and US-A-5932465.

Teachings on a further cyclic nucleotide phosphodiesterase - namely CN PCDE8 - can be found in WO-A-97/35989. According to WO-A-97/35989, CN PCDE8 has two isozymes - which were designated CN PCDE8A and CN PCDE8B. The term "isozyme" is sometimes referred to in the art as "isoform".

According to WO-A-97/35989, many inhibitors of different PDEs have been identified and some have undergone clinical evaluation. For example, PDEIII inhibitors are being developed as antithrombotic agents, as antihypertensive agents and as cardiotonic agents useful in the treatment of congestive heart failure. Rolipram, a PDEIII inhibitor, has been used in the treatment of depression and other inhibitors of PDEIII are undergoing evaluation as anti-inflammatory agents. Rolipram has also been shown to inhibit lipopolysaccharide (LPS) induced TNF-alpha which has been shown to enhance HIV-1 replication *in vitro*. Therefore, rolipram may inhibit HIV-1 replication (Angel *et al* 1995 AIDS 9:1137-44). Additionally, based on its ability to suppress the production of TNF alpha and beta and interferon gamma, rolipram has been shown to be effective in the treatment of encephalomyelitis, the experimental animal model for multiple sclerosis (Sommer *et al*, 1995 Nat Med 1:244-248) and may be effective in the treatment of tardive dyskinesia (Sasaki *et al*, 1995 Eur J Phamacol 282:71-76).

According to WO-A-97/35989, there are also non-specific PDE inhibitors such as theophylline, used in the treatment of bronchial asthma and other respiratory diseases, and pentoxifylline, used in the treatment of intermittent claudication and diabetes-induced peripheral vascular disease. Theophylline is thought to act on airway smooth muscle function as well as in an anti-inflammatory or immunomodulatory capacity in the treatment of respiratory diseases (Banner *et al* 1995 Respir J 8:996-1000) where it is thought to act by inhibiting both CN PDE cAMP and cGMP hydrolysis (Banner *et al* 1995 Monaldi Arch Chest Dis 50:286-292). Pentoxifylline, also known to block TNF-alpha production, may inhibit HIV-1 replication (Angel *et al supra*). A list of CN PDE inhibitors is given in Beavo 1995 *supra*.

It has been suggested that selective inhibitors of PDEs, in addition to their isozymes and their subtypes, will lead to more effective therapy with fewer side effects. For example, see the teachings in the reviews of Wieshaar RE *et al*, (J. Med. Chem., 28:537 [1985]), Giembycz MA (Biochem. Pharm., 43:2041 [1992]) and Lowe JA and Cheng JB (Drugs of the Future, 17:799-807 [1992]).

Thus, for some applications it is desirable to have a selective inhibition of an individual type of PDE.

Background teachings on PDEs have been presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning PDE2 or cGMP-stimulated PDE, has been extracted from that source.

> "Cyclic nucleotides serve as second messengers that mediate a variety of cellular responses to extracellular signals such as hormones, light, and neurotransmitters. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) play a role in signal transduction by regulating the cellular concentrations of cyclic nucleotides. Mammalian cells contain multiple PDEs that are distinguished into at least 7 families based on their substrate affinity and on their selective sensitivity to cofactors and inhibitory drugs. These families are: (I) Ca(2+)/calmodulin-dependent PDEs; (II) cGMP-stimulated PDEs; (III) cGMP-inhibited PDEs; (IV) cAMP-specific PDEs; (V) cGMP-specific PDEs; (VI) photoreceptor PDEs; and (VII) high-affinity, cAMP-specific. From the amino acid sequences, it is evident that all these PDE families contain a related domain, thought to be the catalytic domain, with approximately 30% sequence identity between families. Members of the same family are more closely related; they share 60 to 80% sequence identity throughout the entire coding region.
>
> Michaeli et al. (1993) established a highly sensitive functional screen for the isolation of cDNAs encoding cAMP phosphodiesterases by complementation of defects in the Saccharomyces cerevisiae strain lacking both endogenous cAMP PDE genes, PDE1 and PDE2. Three groups of cDNAs corresponding to 3 distinct human genes

> encoding cAMP-specific PDEs were isolated from a human glioblastoma cDNA library using this functional screen. Two of the genes were closely related to the Drosophila 'dunce' cAMP-specific PDE. The third gene, which Michaeli et al. (1993) referred to as HCP1, encoded a novel cAMP-specific PDE. HCP1 had an amino acid sequence related to the sequences of the catalytic domains of all cyclic nucleotide PDEs. It is a high-affinity cAMP-specific PDE that does not share other properties of the cAMP-specific PDE family, however. The PDE activity of HCP1 was not sensitive to cGMP or other inhibitors of the cGMP-inhibitable PDEs. The biochemical and pharmacologic properties of HCP1 suggested to Michaeli et al. (1993) that it is a member of a previously undiscovered cyclic nucleotide PDE family, which they designated as family VII. Northern blot analysis indicated the presence of high levels of an HCP1 RNA in human skeletal muscle.
>
> By Southern blot analysis of somatic cell hybrid lines, Milatovich et al. (1994) mapped the HCP1 locus to chromosome 8; by study of somatic cell hybrid lines that contained different regions of chromosome 8, they regionalized the assignment to 8q13-q22. Han et al. (1998) mapped the PDE7A gene to 8q13 by fluorescence in situ hybridization. By interspecific backcross analysis, they mapped the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3."

Background teachings on PDE2 have been presented by Jennifer P. Macke et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning PDE2 cGMP-stimulated has been extracted from that source.

> "Rosman et al. (1997) cloned a cDNA corresponding to human PDE2A. The PDE2A gene encodes a 941 amino acid polypeptide with a predicted molecular mass of 106 kD. The protein sequence is 90% identical to bovine and rat PDE2A sequences. Northern blot analysis showed that PDE2A was expressed as a 4.2-kb mRNA at varying levels in all human tissues tested, with greatest expression in brain. Expression studies revealed that PDE2A hydrolyzes cAMP and cGMP and is inhibited by the PDE2A-specific inhibitor EHNA."

Nucleotide sequences and amino acid sequences for PDEs are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

In one aspect, the PDE target is selected from any one or more of the following PDE enzymes: $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 1, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 2, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 3, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 4, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 7 and $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 8.

In a more preferred aspect, the PDE target is selected from any one or more of the following PDE enzymes: $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 1, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 2, $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 3, and $\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ 4.

Preferably, for the present invention, the PDE to target is at least PDE 2.

## I:PDE

As indicated above, the agent may be any suitable agent that can act as an I:PDE.

Broad aspects of this aspect of the present invention therefore relate to:

a) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD (preferably FSAD); the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

b) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD (preferably FSAD); wherein said agent is an I:PDE.

c) A method of treating a female suffering from FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

d) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing vaginal blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

e) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing vaginal blood flow; wherein the agent is an I:PDE.

f) A method of treating a female for FSD (preferably FSAD) or to prevent FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an I:PDE.

1058

More preferred aspects of the present invention encompass:

A) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

B) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD, and wherein said agent is an I:PDE.

C) A method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

D) An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSAD; and wherein said agent is an I:PDE.

E) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing vaginal blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

F) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing vaginal blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; and wherein said agent is an I:PDE.

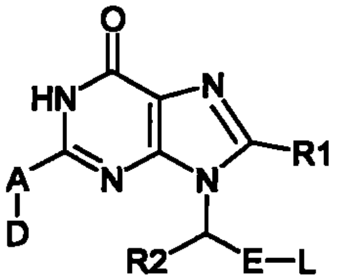
G) A method of treating a female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the female so as to cause enhanced vaginal blood flow; and wherein said agent is an I:PDE.

Examples of I:PDE are disclosed in EP-A-091133 and EP-A-0771799.

Preferably, the I:PDE is an I:PDE2. Thus, preferred example compounds are those presented in EP-A-0771799.

For convenience, claim 1 of EP-A-0771799 is now repeated:

A purin-6-one derivative with general formula (I):



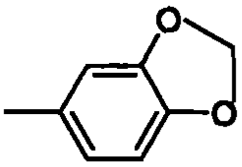
wherein:

| | |
|---|---|
| $R^1$ | represents hydrogen or a linear or branched alkyl containing up to 8 carbon atoms; |
| $R^2$ | represents a linear or branched acyl containing up to 4 carbon atoms, or a linear or branched alkyl containing up to 8 carbon atoms optionally substituted by hydroxyl, azido or a group with formula $-NR^3R^4$ or $-OSO_2R^5$; wherein |
| $R^3$ and $R^4$ | are identical or different and represent a cycloalkyl containing 3 to 6 carbon atoms, hydrogen, formyl, or a linear or branched alkyl containing up to 6 carbon atoms, optionally substituted by a linear or branched alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 6 carbon atoms or by a group with formula $-(CO)_a-NR^6R^7$, wherein |
| a | is the number 0 or 1; |
| $R^6$ and $R^7$ | are identical or different and represent hydrogen, formyl, hydroxyl, phenyl or a linear or branched alkyl containing up to 6 carbon atoms, optionally substituted by hydroxyl or a linear or branched alkoxy containing up to 5 carbon atoms; or |
| $R^3$ and/or $R^4$ | represent a linear or branched alkoxycarbonyl containing up to 6 carbon atoms, carboxyl or a linear or branched acyl containing up to 6 carbon atoms optionally substituted by hydroxyl or a linear or branched alkoxy containing up to 4 carbon atoms; or |
| $R^3$ and/or $R^4$ | represent a residue with formula $-(CO)_b-T-NR^8R^9$, $-CO-R^{10}$, $-SO_2R^{11}$ or $-SO_2NR^{12}R^{13}$, wherein |

| | |
|---|---|
| b | has the meaning given above for a and is identical thereto or different therefrom; |
| T | can represent a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms, or when $b \neq 0$ it can also represent a bond; |
| $R^8$ and $R^9$ | have the meaning given for $R^6$ and $R^7$ above and are identical thereto or different therefrom; |
| $R^{10}$ | represents a saturated, partially unsaturated or unsaturated 5- to 7-membered heterocycle containing up to 3 heteroatoms selected from S, N and/or O, which can optionally also be substituted on the N function by a linear or branched alkyl, alkoxy or alkoxycarbonyl containing up to 4 carbon atoms, carboxyl, benzyloxycarbonyl or hydroxyl; |
| $R^{11}$ | represents a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms, benzyl or phenyl; |
| $R^{12}$ and $R^{13}$ | are identical or different and represent hydrogen, phenyl or a linear or branched alkyl containing up to 6 carbon atoms;<br>or |
| $R^3$ and $R^4$ | together with the nitrogen atom form a 5- or 6-membered saturated, partially unsaturated or unsaturated heterocycle which can contain up to 3 heteroatoms selected from N, S and/or O or a $-NR^{14}$ residue, and which is optionally substituted by carbonyl, a linear or branched alkoxycarbonyl containing up to 5 carbon atoms or a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms which in its turn can be substituted by hydroxyl, carboxy or a linear or branched acyl, alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 6 carbon atoms; wherein |
| $R^{14}$ | represents hydrogen, carbonyl or a linear or branched alkyl or alkoxycarbonyl respectively containing up to 5 carbon atoms; and |
| $R^5$ | represents phenyl or a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms; |
| A | represents a linear or branched alkylene or alkenylene chain respectively containing up to 6 carbon atoms; |

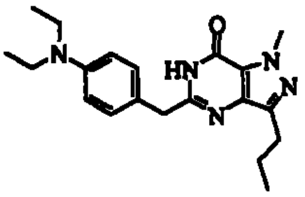
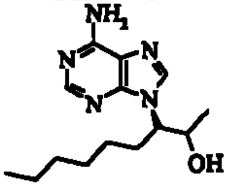
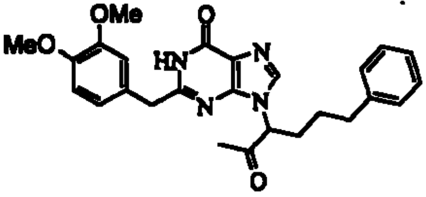
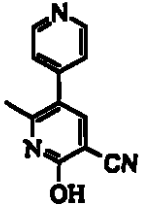
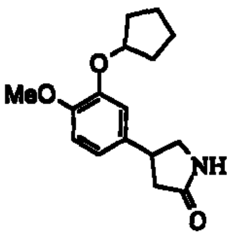
| | |
|---|---|
| D and L | are identical or different and represent an aryl containing 6 to 10 carbon atoms or a 5- to 7-membered aromatic, optionally benzocondensed heterocycle containing up to 3 heteroatoms selected from S, N and/or O, optionally substituted up to 3 times, identically or differently, by a halogen, hydroxyl, nitro, trifluoromethyl, carboxy, a linear or branched alkyl, alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 6 carbon atoms or by a group with formula $-(V)_c-NR^{15}R^{16}$ and/or $-OR^{17}$; wherein |
| c | is the number 0 or 1; |
| V | represents a residue with formula $-CO$ or $-SO_2$; |
| $R^{15}$ and $R^{16}$ | are identical or different and have the meaning given for $R^3$ and $R^4$ above; |
| $R^{17}$ | represents hydrogen, a linear or branched alkenyl containing up to 8 carbon atoms or a linear or branched alkyl containing up to 8 carbon atoms, optionally substituted up to 3 times, identically or differently, with hydroxyl, carbonyl or linear or branched alkoxycarbonyl containing up to 5 carbon atoms; and/or the cycles are optionally substituted by an aryl containing 6 to 10 carbon atoms or by a 5- to 7-membered aromatic, optionally benzocondensed heterocycle containing up to 3 heteroatoms selected from S, N and/or O, which in its turn is optionally substituted up to two times, identically or differently, by a halogen, hydroxyl, nitro, carboxyl, trifluoromethyl or a linear or branched alkyl, alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 5 carbon atoms or with a group with formula $(V')_d-NR^{18}R^{19}$; wherein |
| d | has the meaning given above for a and is identical thereto or different therefrom; |
| $R^{18}$ and $R^{19}$ | have the meaning given above for $R^3$ and $R^4$ and are identical thereto or different therefrom; |

| | |
|---|---|
| V' | has the meaning given above for V and is identical thereto or different therefrom; and/or<br>represents the ring system given below for D, optionally substituted by a linear or branched acyl containing up to 5 carbon atoms, optionally substituted by hydroxyl, a linear or branched alkoxy containing up to 5 carbon atoms or by a group with formula $-NR^{20}R^{21}$; wherein |
| $R^{20}$ and $R^{21}$ | are identical or different and have the meaning given above for $R^3$ and $R^4$; or |
| E | Represents a residue with formula $-CH_2$-Y-Z-; wherein |
| Y | Represents a bond or an oxygen or sulphur atom or the group –NH-; |
| Z | Represents a linear or branched alkyl chain containing up to 5 carbon atoms; |
| D | represents a residue with formula |



and tautomers and salts thereof.

Preferred I:PDEs are selected from the following structures:

| **Compound** | **Structure** | **Mode of action**<br>**References** |
|---|---|---|
| | | |
| **FIa** |  | I:PDE1<br>EP-A-0911333<br>(Example 50) |
| **FIb** |  | I:PDE2<br>EHNA<br>(also an inhibitor of Adenosinedeaminase) |
| FII |  | I:PDE2<br>EP-A-0771799<br>(Example 100) |
| FIII |  | I:PDE3<br>Milrinone<br>(which is commercially available) |
| FIV |  | I:PDE4<br>Rolipram<br>(which is commercially available) |

NEP (neutral endopeptidase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is NEP.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for NEP is available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

In one aspect, the NEP is NEP (EC 3.4.24.11) (also known as enkephalinase or endopeptidase-2). Here, we have found NEP EC 3.4.24.11 mRNA and expressed protein in human and rabbit vagina.

Here, we believe that in females including those suffering from FSAD, VIP is degraded by NEP EC3.4.24.11. Thus, NEP inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of VIP released during arousal. This will lead to a treatment of FSAD, such as through enhanced vaginal engorgement. We have shown that selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 enhance pelvic nerve-stimulated and VIP-induced increases in vaginal blood flow. In addition that selective NEP inhibitors enhance VIP and nerve-mediated relaxations of isolated vagina wall.

Background teachings on NEP have been presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning NEP has been extracted from that source.

> "Common acute lymphocytic leukemia antigen is an important cell surface marker in the diagnosis of human acute lymphocytic leukemia (ALL). It is present on leukemic cells of pre-B phenotype, which represent 85% of cases of ALL. CALLA is not restricted to leukemic cells, however, and is found on a variety of normal tissues. CALLA is a glycoprotein that is particularly abundant in kidney, where it is present on the brush border of proximal tubules and on glomerular epithelium. Letarte et al. (1988) cloned a cDNA coding for CALLA and showed that the amino acid sequence deduced from the cDNA sequence is identical to that of human membrane-associated neutral endopeptidase (NEP; EC 3.4.24.11 ), also known as enkephalinase. NEP cleaves peptides at the amino side of hydrophobic residues and inactivates several peptide hormones including glucagon, enkephalins, substance P, neurotensin, oxytocin, and bradykinin. By cDNA transfection analysis, Shipp et al. (1989) confirmed that CALLA is a functional neutral endopeptidase of the type that has previously been called enkephalinase. Barker et al. (1989) demonstrated that the

1062

CALLA gene, which encodes a 100-kD type II transmembrane glycoprotein, exists in a single copy of greater than 45 kb which is not rearranged in malignancies expressing cell surface CALLA. The gene was located to human chromosome 3 by study of somatic cell hybrids and in situ hybridization regionalized the location to 3q21-q27. Tran-Paterson et al. (1989) also assigned the gene to chromosome 3 by Southern blot analysis of DNA from human-rodent somatic cell hybrids. D'Adamio et al. (1989) demonstrated that the CALLA gene spans more than 80 kb and is composed of 24 exons."

## I:NEP

As indicated above, the agent may be any suitable agent that can act as an I:NEP.

Broad aspects of this aspect of the present invention therefore relate to:

a) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD (preferably FSAD); the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NEP.

b) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD (preferably FSAD); wherein said agent is an I:NEP.

c) A method of treating a female suffering from FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NEP.

d) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing vaginal blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NEP.

e) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing vaginal blood flow; wherein the agent is an I:NEP.

f) A method of treating a female for FSD (preferably FSAD) or to prevent FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an I:NEP.

More preferred aspects of the present invention encompass:

A) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NEP.

B) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD, and wherein said agent is an I: NEP.

C) A method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I: NEP.

D) An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSAD; and wherein said agent is an I: NEP.

E) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing vaginal blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I: NEP.

1063

F) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing vaginal blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; and wherein said agent is an I: NEP.

G) A method of treating a female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the female so as to cause enhanced vaginal blood flow; and wherein said agent is an I: NEP.

Details on a suitable assay system for identifying and/or studying an I:NEP are presented in the following section.

I:NEPs are discussed in the following review articles:

Pathol. Biol., 46(3), 1998, 191.
Current Pharm. Design, 2(5), 1996, 443.
Biochem. Soc. Trans., 21(3), 1993, 678.
Handbook Exp. Pharmacol., 104/1, 1993, 547.
TIPS, 11, 1990, 245.
Pharmacol. Rev., 45(1), 1993, 87.
Curr. Opin. Inves. Drugs, 2(11), 1993, 1175.
Antihypertens. Drugs, (1997), 113.
Chemtracts, (1997), 10(11), 804.
Zinc Metalloproteases Health Dis. (1996), 105.
Cardiovasc. Drug Rev., (1996), 14(2), 166.
Gen. Pharmacol., (1996), 27(4), 581.
Cardiovasc. Drug Rev., (1994), 12(4), 271.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., (1995), 22(1), 63.
Cardiovasc. Drug Rev., (1991), 9(3), 285.
Exp. Opin. Ther. Patents (1996), 6(11), 1147.

I:NEPs are disclosed in the following documents:

EP-509442A

US-192435

US-4929641

EP-599444B

US-884664

EP-544620A

US-798684

J. Med. Chem. 1993, 3821.

Circulation 1993, 88(4), 1.

EP-136883

JP-85136554

US-4722810

Curr. Pharm. Design, 1996, 2, 443.

EP-640594

J. Med. Chem. 1993, 36(1), 87.

EP-738711-A

JP-270957

CAS # 115406-23-0

DE-19510566

DE-19638020

EP-830863

JP-98101565

EP-733642

WO9614293

JP-08245609

JP-96245609

WO9415908

JP05092948

WO-9309101

WO-9109840

EP-519738

EP-690070

J. Med. Chem. (1993), 36, 2420.

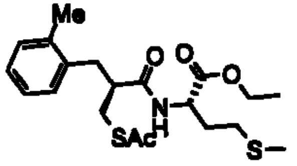
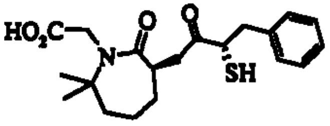
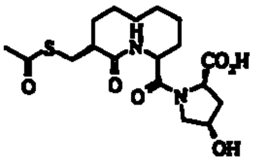
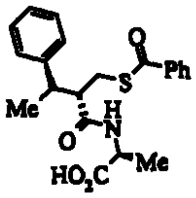
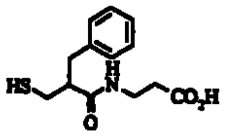
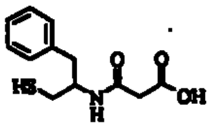
JP-95157459

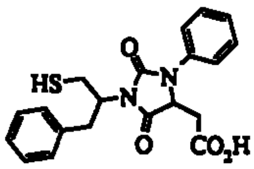
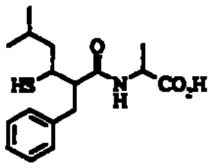
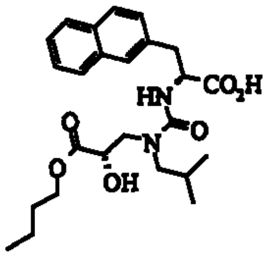
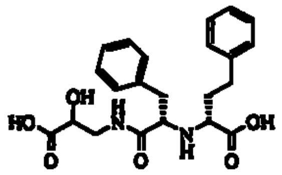
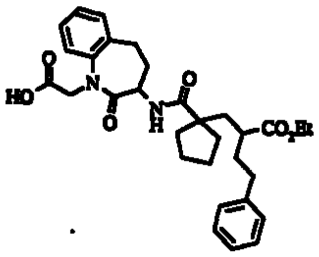
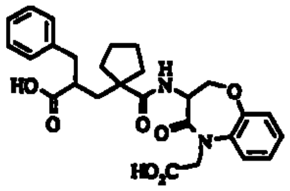
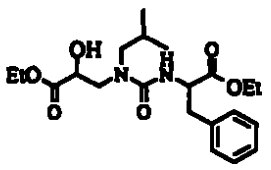
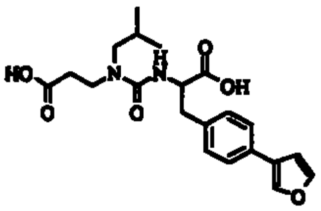
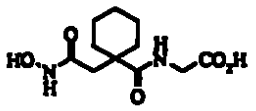
Bioorg. Med. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65.

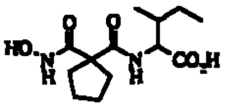
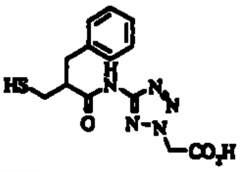
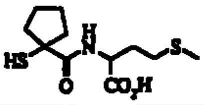
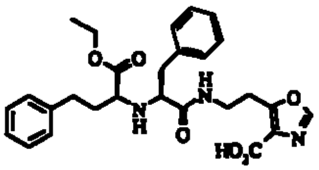
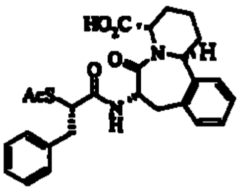
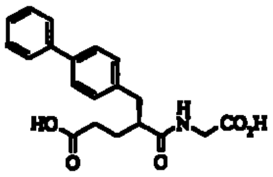
Preferred I:NEPs are disclosed in the following documents:

EP-A-0274234
JP-88165353
Biochem.Biophys.Res. Comm.,1989, 164, 58
EP-629627-A
US-77978
Perspect. Med. Chem. (1993), 45.
EP-358398-B

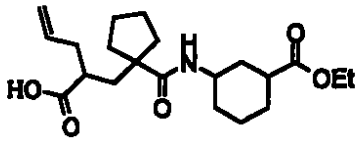
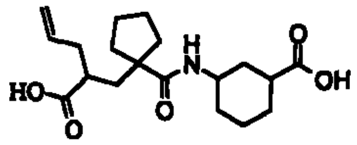
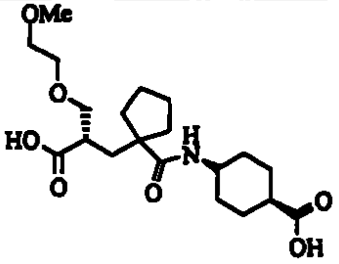
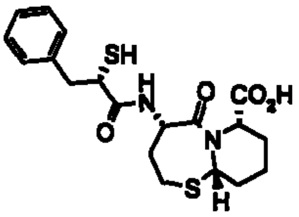
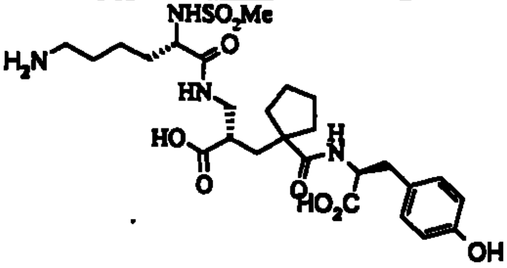
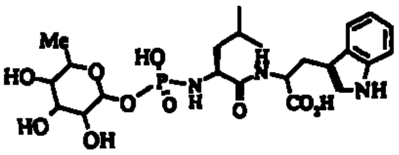
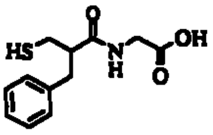
Preferred examples of I:NEPs are selected from the following structures:

| **Compound** | **Structure** | **Mode of Action**<br>**References** |
|---|---|---|
| | | |
| FXII |  | I:NEP<br>EP-509442A<br>US-192435<br>US-4929641 |
| FXIII |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>EP-599444B<br>US-884664 |
| FXIV |  | I:NEP<br>EP-544620A<br>US-798684<br>J. Med. Chem.<br>1993, 3821. |
| FXV |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>Mixanpril<br>Circulation<br>1993, 88(4), 1. |
| FXVI |  | I:NEP<br>EP-136883<br>JP-85136554<br>US-4722810 |
| FXVII |  | I:NEP<br>Retrothiorphan<br>Curr. Pharm. Design,<br>1996, 2, 443. |

| | | |
|---|---|---|
| FXVIII |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>EP-640594 |
| FXIX |  | I:NEP<br>J. Med. Chem.<br>1993, 36(1), 87. |
| FXX |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>EP-738711-A<br>JP-270957 |
| FXXI |  | I:NEP<br>CAS #<br>115406-23-0 |
| FXXII |  | I:NEP<br>(also an ECE inhibitor)<br>DE-19510566<br>DE-19638020<br>EP-830863<br>JP-98101565 |
| FXXIII |  | I:NEP<br>(also an ECE inhibitor)<br>EP-733642 |
| FXXIV |  | I:NEP<br>WO96/14293 |
| FXXV |  | I:NEP<br>JP-08245609<br>JP-96245609 |
| FXXVI |  | I:NEP<br>WO9415908 |

| | | |
|---|---|---|
| FXXVII |  | I:NEP<br>JP05092948 |
| FXXVIII |  | I:NEP<br>WO-9309101 |
| FXXIX |  | I:NEP<br>WO-9109840 |
| FXXXI |  | I:NEP<br>EP-519738<br>EP-690070 |
| FXXXII |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>J. Med. Chem. (1993),<br>36, 2420. |
| FXXXIII |  | I:NEP<br>JP-95157459<br>Bioorg. Med. Chem.<br>Letts., 1996, 6(1), 65. |

More preferred I:NEPs are selected from the following structures:

| Compound | Structure | Mode of Action<br>References |
|---|---|---|
| | | |
| FV |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(Example 300) |
| FVI |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(Example 379) |
| FVII |  | I:NEP<br>Candoxatrilat<br>EP-274234<br>JP-88165353<br>Biochem.Biophys.Res. Comm.,1989, 164, 58 |
| FVIII |  | I:NEP<br>Omapatrilat<br>(also an inhibitor of ACE)<br>EP-0629627-A<br>US-77978 |
| FIX |  | I:NEP<br>Sampatrilat<br>(also an inhibitor of ACE)<br>Perspect. Med. Chem. (1993), 45.<br>EP-0358398-B |
| FX |  | I:NEP<br>Phosphoramidon<br>(which is commercially available) |
| FXI |  | I:NEP<br>Thiorphan<br>(which is commercially available) |

## NEP ASSAY

## THE PREPARATION AND ASSAY OF SOLUBLE (NEP) NEUTRAL ENDOPEPTIDASE FROM CANINE, RAT, RABBIT AND HUMAN KIDNEY CORTEX.

**Soluble NEP is obtained from the kidney cortex and activity is assayed by measuring the rate of cleavage of the NEP substrate Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp to generate its fluorescent product, Abz-D-Arg-Arg.**

## EXPERIMENTAL PROCEDURE:-

### 1. MATERIALS

All water is double de ionised.

### 1.1 Tissues

| | |
|---|---|
| Human Kidney | IIAM (Pennsylvania. U.S.A.) |
| Rat Kidney | In house tissue supply |
| Rabbit Kidney | In house tissue supply |
| Canine Kidney | In house tissue supply |

### 1.2 Homogenisation medium

100mM Mannitol and 20mM Tris @ pH 7.1

2.42g Tris (Fisher T/P630/60) is diluted in 1 litre of water and the pH adjusted to 7.1 using 6M HCl at room temperature. To this 18.22g Mannitol (Sigma M-9546) is added.

### 1.3 Tris buffer (NEP buffer).

50ml of 50mM Tris pH 7.4 (Sigma T2663) is diluted in 950ml of water.

### 1.4 Substrate (Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp)

Made to order from SNPE, and is stored as a powder at –20°C. A 2mM stock is made by gently re-suspending the substrate in Tris buffer, this should not be vortexed or sonicated. 600µl aliquots of the 2mM stock are stored at –20 for up to one month.

1.5 Total product

Samples corresponding to 100% substrate to product conversion are included on the plate to enable the % substrate turnover to be determined. The total product is generated by incubating 1ml of 2mM substrate with 20µl of enzyme stock for 24 hours at 37°C.

1.6 Stop solution.

A 300µM stock of Phosphoramidon (Sigma R7385) is made up in NEP buffer and stored in 50µl aliquots at -20.

1.7 Dimethyl sulphoxide (DMSO).

1.8 Magnesium Chloride -$MgCl_2.6H_2O$ (Fisher M0600/53).

1.9 Black 96 well flat bottom assay plates (Costar 3915).

1.10 Topseal A (Packard 6005185).

1.11 Centrifuge tubes

## 2. SPECIFIC EQUIPTMENT

2.1 Sorvall RC-5B centrifuge (SS34 GSA rotor, pre-cooled to 4°C).

2.2 Braun miniprimer mixer.

2.3 Beckman CS-6R centrifuge.

2.4 Fluostar galaxy.

2.5 Wesbart 1589 shaking incubator.

## 3. METHODS

3.1 TISSUE PREPARATION

3.2 Dog, rat, rabbit, and human NEP is obtained from the kidney cortex.

3.3 Frozen kidneys are allowed to thaw at room temperature and the cortex is dissected away from the medulla.

3.4 The cortex is finely chopped and homogenised in approximately 10 volumes of homogenisation buffer (1.2) using a Braun miniprimer (2.2).

3.5 Magnesium chloride (1.8) (20.3mg/gm tissue) is added to the homogenate and stirred in an ice-water bath for 15 minutes.

3.6 The homogenate is centrifuged at 1,500g (3,820rpm) for 12 minutes in a Beckman centrifuge (2.3) before removing the supernatant to a fresh centrifuge tube and discarding the pellet.

3.7 The supernatant is centrifuged at 15,000g (12,100rpm) for 12 minutes in a Sovall centrifuge (2.1) and the supernatant is discarded.

3.8 The pale pink layer on the top of the remaining pellet is removed and re-suspended in homogenisation buffer containing magnesium chloride (9mg MgCl in 5ml buffer per 1g tissue).

3.9 The suspension is centrifuged at 2,200g (4,630rpm) for 12 minutes in a Beckman centrifuge (2.3) before discarding the pellet.

3.10 The supernatant is centrifuged at 15,000g (12,100rpm) for 12 minutes using the Sorvall centrifuge (2.1) and the supernatant is discarded.

3.11 The final pellet is resuspended in homogenisation buffer containing magnesium chloride (0.9mg MgCl in 0.5ml buffer per 1g tissue). A homogenous suspension is obtained using a Braun miniprimer (2.2). This is then frozen down in 100µl aliquots to be assayed for NEP activity.

## 4.0 DETERMINATION OF NEP ACTIVITY

The activity of the previously aliquoted NEP is measured by its ability to cleave the NEP specific peptide substrate.

4.1 A 4% DMSO/NEP buffer solution is made (4mls DMSO in 96mls NEP buffer).

4.2 Substrate, total product, enzyme, and Phosphoramidon stocks are left on ice to thaw.

4.3 50µl of 4% DMSO/NEP buffer solution is added to each well.

4.4 The 2mM substrate stock is diluted 1:40 to make a 50µM solution. 100µl of 50µM substrate is added to each well (final concentration 25µM).

4.5 50µl of a range of enzyme dilutions is added to initiate the reaction (usually 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, and 1:3200 are used). 50µl of NEP buffer is added to blank wells.

4.6 The 2mM total product is diluted 1:80 to make a 25µM solution. 200µl of 25µM product is added to the first four wells of a new plate.

4.7 Plates are incubated at 37oC in a shaking incubator for 60 minutes.

4.8 The 300µM Phosphoramidon stock is diluted 1:100 to 300nM. The reaction is stopped by the addition of 100µl 300nM Phosphoramidon and incubated at 37$^0$C in a shaking incubator for 20 minutes before being read on the Fluostar (ex320/em420).

## 5. NEP INHIBITION ASSAYS

5.1 Substrate, total product, enzyme and Phoshoramidon stocks are left on ice to thaw.

5.2 Compound stocks are made up in 100% DMSO and diluted 1:25 in NEP buffer to give a 4% DMSO solution. All further dilutions are carried out in a 4% DMSO solution (4mls DMSO in 96mls NEP buffer).

5.3 50µl of compound in duplicate is added to the 96 well plate and 50µl of 4% DMSO/NEP buffer is added to control and blank wells (see appendix for plate layout). Alternatively see appendix for robotic dilutions.

5.4 The 2mM substrate stock is diluted 1:40 in NEP buffer to make a 50µM solution (275µl 2mM substrate to 10.73ml buffer is enough for 1 plate).

5.5 The enzyme stock diluted in NEP buffer (determined from activity checks).

5.6 The 2mM total product stock is diluted 1:80 in NEP buffer to make a 25µM solution. 200µl is added to the first four wells of a separate plate.

5.7 The 300µM Phosphoramidon stock is diluted 1:1000 to make a 300nM stock (11µl Phosphoramidon to 10.99ml NEP buffer.

5.8 To each well in the 96 well plate the following is added:

Table Reagents to be added to 96 well plate.

| | Compound/ DMSO | Tris Buffer | Substrate | NEP enzyme | Total product |
|---|---|---|---|---|---|
| Samples | 2µl compound | 50µl | 100µl | 50µl | None |
| Controls | 2µl DMSO | 50µl | 100µl | 50µl | None |
| Blanks | 2µl DMSO | 100µl | 100µl | None | None |
| Totals | 2µl DMSO | None | None | None | 200µl |

5.9 The reaction is initiated by the addition of the NEP enzyme before incubating at 37°C for 1 hour in a shaking incubator.

5.10 The reaction is stopped with 100µl 300nM Phosphoramidon and incubated at 37°C for 20 minutes in a shaking incubator before being read on the Fluostar (ex320/em420).

## 6. CALCULATIONS

The activity of the NEP enzyme is determined in the presence and absence of compound and expressed as a percentage.

% Control activity (turnover of enzyme):

$$\frac{\text{Mean FU of controls} - \text{Mean FU of blanks}}{\text{Mean FU of totals} - \text{Mean FU of blanks}} \times 100$$

% Activity with inhibitor:

$$\frac{\text{Mean FU of compound} - \text{Mean FU of blanks}}{\text{Mean FU of totals} - \text{Mean FU of blanks}} \times 100$$

Activity expressed as % of control:

$$\frac{\text{\% Activity with inhibitor}}{\text{\% Control activity}} \times 100$$

A sigmoidal dose-response curve is fitted to the % activities (% of control) vs compound concentration and IC50 values calculated using LabStats fit-curve in Excel.

NPY (neuropeptide Y)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is NPY or one of its associated receptors.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for NPY and its receptors are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

Here, we have found that neuropeptide Y (NPY) exerts an inhibitory regulatory influence over vasoactive intestinal peptide (VIP)-mediated vasorelaxation.Thus, inhibition of NPY receptors will result in an increased pelvic nerve and VIP-mediated increases in vaginal blood flow ie take the break off vasorelaxation. Clinically this will lead to increased vaginal engorgement which will ultimately lead to increased lubrication *via* plasma transudation and increased vaginal compliance. Hence, a suitable target for the treatment of FSAD is NPY or one of its associated receptors.

Thus, in one preferred aspect, the agent is an NPY $Y_1$ $Y_2$ or $Y_5$ antagonist, preferably an oral NPY $Y_1$ $Y_2$ or $Y_5$ antagonist. This agent will treat FSAD by increasing vaginal blood flow and increasing lubrication.

The NPY-mediated antagonism of VIP-induced increases in blood flow therefore represents a potential therapeutic target by which blood flow in the female genital tract can be influenced. The mechanism through which this antagonism occurs is most likely through NPY $Y_1$ receptor-induced $G_{i/o}$ activation. In other physiological systems NPY $Y_1$ receptors have been implicated in mediating vasoconstriction and inhibiting sympathetic transmitter release (Lundberg *et al.*, 1996; a NPY $Y_2$ effect can not be excluded). We believe in the female genital tract that NPY inhibits vasorelaxation via direct inhibition of adenylate cyclase direct inhibiting VIP release or sympathetic neurotransmission.

As indicated, a $P_{cAMP}$ target is one of the NPY receptors.

The neuronal release of NPY regulates the VIP-induced vasorelaxation of the vaginal vascular bed. This most likely occurs *via* a presynaptic mechanism involving NPY $Y_1$ receptors, although a post-synaptic mode of action can not be excluded. An NPY antagonist will potentiate VIP-induced vasodilation of the vaginal vascular beds. Clinically this will lead to increased vaginal lubrication and compliance *via* vaginal wall engorgement.

NPY receptor expression studies performed by us have identified NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes within the human vagina.

Hence, in one aspect, the $P_{cAMP}$ target is one or more of the NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes.

Background teachings on NPY and it associated receptors have been prepared by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning NPY has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY) is an abundant and widespread peptide in the mammalian nervous system. It shows sequence homology to peptide YY and over 50% homology in amino acid and nucleotide sequence to pancreatic polypeptide (PNP; 167780). NPY is a 36-amino acid peptide. Minth et al. (1984) cloned the NPY gene starting from mRNA of a pheochromocytoma. Takeuchi et al. (1985, 1986) isolated cDNA clones of the NPY and PNP genes from a pheochromocytoma and a pancreatic endocrine tumor, respectively. Using these cDNA probes to analyze genomic DNA from chromosome assignment panels of human-mouse somatic cell hybrids, they then examined the question of whether the genes are syntenic. The studies showed nonsynteny, with NPY on 7pter-7q22 and PNP on 17p11.1-17qter. By studies of a backcross with Mus spretus, Bahary et al. (1991) mapped the homologous NPY gene to mouse chromosome 6. Since mouse chromosome 6 has

1069

homology to human 7q, it is likely that the NPY gene in man is located in the region 7cen-q22. Meisler et al. (1987) excluded close linkage between the loci for cystic fibrosis (219700) and neuropeptide Y. Terenghi et al. (1987) determined the distribution of mRNA encoding NPY in neurons of the cerebral cortex in surgical biopsy specimens and postmortem brain by means of in situ hybridization techniques. They showed consistent localization of NPY gene transcription and expression in normal mature cortical neurons. Baker et al. (1995) showed by fluorescence in situ hybridization that the NPY gene is located on 7p15.1 and exists in single copy. They commented that NPY is one of the most highly conserved peptides known, with, for example, only 3 amino acid differences between human and shark. Neuropeptide Y is a neuromodulator implicated in the control of energy balance and is overproduced in the hypothalamus of ob/ob mice. To determine the role of NPY in the response to leptin (164160) deficiency, Erickson et al. (1996) generated ob/ob mice deficient in NPY. In the absence of NPY, ob/ob mice were less obese because of reduced food intake and increased energy expenditure, and were less severely affected by diabetes, sterility, and somatotropic defects. These results were interpreted as indicating that NPY is a central effector of leptin deficiency. Genetic linkage analysis of rats that were selectively bred for alcohol preference identified a chromosomal region that included the NPY gene (Carr et al., 1998). Alcohol-preferring rats had lower levels of NPY in several brain regions compared with alcohol-nonpreferring rats. Thiele et al. (1998) therefore studied alcohol consumption by mice that completely lacked NPY as a result of targeted gene disruption (Erickson et al., 1996). They found that NPY-deficient mice showed increased consumption, compared with wildtype mice, of solutions containing 6%, 10%, and 20% (by volume) ethanol. NPY-deficient mice were also less sensitive to the sedative/hypnotic effects of ethanol, as shown by more rapid recovery from ethanol-induced sleep, even though plasma ethanol concentrations did not differ significantly from those of controls. In contrast, transgenic mice that overexpressed a labeled NPY gene in neurons that usually express it had a lower preference for ethanol and were more sensitive to the sedative/hypnotic effects of ethanol than controls. These data provided direct evidence that alcohol consumption and resistance are inversely related to NPY levels in the brain. As part of an on-going study of the genetic basis of obesity, Karvonen et al. (1998) identified a 1128T-C polymorphism that resulted in substitution of leucine by proline at residue 7 in the signal peptide part of pre-pro-NPY. This polymorphism was not associated with obesity or energy metabolism, but was significantly and consistently associated with high serum total and LDL cholesterol levels both in normal-weight and obese Finns and in obese Dutch subjects. Uusitupa et al. (1998) found the pro7 polymorphism in 14% of Finns but in only 6% of Dutchmen. Subjects with pro7 in NPY had, on average, 0.6 to 1.4 mmol/L higher serum total cholesterol levels than those without this gene variant. As the impact of pro7 NPY on serum cholesterol levels could not be found in normal-weight Dutchmen, it can be assumed that obese persons may be more susceptible to the effect of the gene variant. It was calculated that the probability of having the pro7 in NPY could be as high as 50 to 60% in obese subjects with a total serum cholesterol equal to or higher than 8 mmol/L. At least among Finns, the pro7 form of NPY is one of the strongest genetic factors affecting serum cholesterol levels. SEE ALSO Allen and Bloom (1986) ; Dockray (1986) ; Maccarrone and Jarrott (1986) ; Minth et al. (1986)."

As indicated background teachings on NPY and it associated receptors have been prepared by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning NPYR1 has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY; 162640) is one of the most abundant neuropeptides in the mammalian nervous system and exhibits a diverse range of important physiologic activities, including effects on psychomotor activity, food intake, regulation of central endocrine secretion, and potent vasoactive effects on the cardiovascular system. Two major subtypes of NPY (Y1 and Y2) have been defined by pharmacologic criteria. The NPY Y1 receptors have been identified in a variety of tissues, including brain, spleen, small intestine, kidney, testis, placenta, and aortic smooth muscle. The Y2 receptor is found mainly in the central nervous system. Herzog et al. (1992) reported cloning of a cDNA encoding a human NPY receptor which they confirmed to be a member of the G protein-coupled receptor superfamily. When expressed in Chinese hamster ovary (CHO) or human embryonic kidney cells, the receptor exhibited characteristic ligand specificity. In the kidney cell line, the receptor was coupled to a pertussis toxin-sensitive G protein that mediated the inhibition of cyclic AMP accumulation. In the CHO cell line, on the other hand, the receptor was coupled not to inhibition of adenylate cyclase but rather to the elevation of intracellular calcium. Thus the second messenger coupling of the NPY receptor was cell type specific, depending on the specific repertoire of G proteins and effector systems present in the cell type. . Larhammar et al. (1992) independently cloned and characterized the neuropeptide Y receptor. Herzog et al. (1993) determined the molecular organization and regulation of the human NPY Y1 receptor gene. In contrast to the contiguous structure of most G protein-coupled receptor genes, they found that the NPY Y1 receptor gene has 3 exons. They also identified a common PstI polymorphism in the first intron of the gene. By high resolution fluorescence in situ hybridization, they localized the gene to 4q31.3-q32. Herzog et al. (1997) found that the NPY1R and NPY5R (602001) genes are colocalized on chromosome 4q31-q32. The 2 genes are transcribed in opposite directions from a common promoter region. One of the alternately spliced 5-prime exons of the Y1 receptor gene is a part of the coding sequence of the Y5 receptor. This unusual arrangement suggested to Herzog et al. (1997) that the 2 genes arose by a gene duplication event and that they may be coordinately expressed. By interspecific backcross analysis, Lutz et al. (1997) mapped the Npy1r and Npy2r genes to conserved linkage groups on mouse chromosomes 8 and 3, respectively, which correspond to the distal region of human chromosome 4q."

As indicated background teachings on NPY and it associated receptors has been prepared by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning NPYR2 has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY) signals through a family of G protein-coupled receptors present in the brain and sympathetic neurons. At least 3 types of neuropeptide Y receptor have been defined on the basis of pharmacologic criteria, tissue distribution, and structure of the encoding gene; see 162641 and 162643. Rose et al. (1995) reported the expression cloning in COS cells of a cDNA for the human type 2 receptor, NPY2R. Transfected cells showed high affinity for NPY (162640), peptide YY (PYY; 600781), and a fragment of NPY including amino acids 13 to 36. The predicted 381-amino acid protein has 7 transmembrane domains characteristic of G protein-coupled receptors and is only 31% identical to the human Y1 receptor (NPY1R; 162641). A 4-kb mRNA was detected on Northern blots of tissue samples from several regions of the nervous system. Gerald et al. (1995) cloned the cDNA corresponding to the human Y2 receptor from a human hippocampal cDNA expression library using a radiolabeled PYY-binding assay. They expressed the Y2 gene in COS-7 cells and performed a hormone-binding assay which showed that the Y2 receptor binds (from highest to lowest affinity) PYY, NPY, and pancreatic polypeptide (PP; 167780) hormones. Ammar et al. (1996) cloned and characterized the human gene encoding the type 2 NPY receptor. The transcript spans 9 kb of genomic sequence and is encoded in 2 exons. As in the type 1 NPY receptor gene, the 5-prime untranslated region of NPY2R is interrupted by a 4.5-kb intervening sequence. Ammar et al. (1996) demonstrated by Southern analysis of rodent-human cell hybrids followed by fluorescence in situ hybridization (FISH) that the NPY2R gene maps to 4q31, the same region containing the NPY1R gene, suggesting that these subtypes may have arisen by gene duplication despite their structural differences. By interspecific backcross analysis, Lutz et al. (1997) mapped the Npy1r and Npy2r genes to conserved linkage groups on mouse chromosomes 8 and 3, respectively, which correspond to the distal region of human chromosome 4q."

An assay for determining whether a putative or actual agent according to the present invention can bind to NPY is presented in WO-A-98/52890 (see page 96 thereof, lines 2 to 28).

I:NPY

As indicated above, the agent may be any suitable agent that can act as an I:NPY (sometimes referred to as an NPY antagonist).

Broad aspects of this aspect of the present invention therefore relate to:

a) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD (preferably FSAD); the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NPY.

b) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD (preferably FSAD); wherein said agent is an I:NPY.

c) A method of treating a female suffering from FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NPY.

d) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing vaginal blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NPY.

e) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing vaginal blood flow; wherein the agent is an I:NPY.

f) A method of treating a female for FSD (preferably FSAD) or to prevent FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an I:NPY.

More preferred aspects of the present invention encompass:

A) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NPY.

B) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD, and wherein said agent is an I: NPY.

C) A method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I: NPY.

D) An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSAD; and wherein said agent is an I: NPY.

E) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing vaginal blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I: NPY.

F) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing vaginal blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; and wherein said agent is an I: NPY.

G) A method of treating a female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the

1072

female so as to cause enhanced vaginal blood flow; and wherein said agent is an I: NPY.

I:NPYs (in particular NPY antagonists) are discussed in the following review articles:

Dunlop J, Rosenzweig-Lipson S : Therapeutic approaches to obestity Exp Opin Ther Pat 1999.8 12 1683 -1694

Wang S, Ferguson KC, Burris TP, Dhurandhar NV: 8th annual international conference on obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus: novel drug developments. Exp Opin Invest Drugs 1999 8 7 1117 -1125

Ling AL : Neuropeptide Y receptor antagonists Exp Opin Ther Pat 1999 9 4 375-384

Adham N, Tamm J, Du P, Hou C, et al : Identification of residues involved in the binding of the antagonist SNAP 6608 to the Y5 receptor Soc Neurosci Abstr 1998 24 part 2 626.9

Shu YZ, Cutrone JQ, Klohr SE, Huang S : BMS-192548, a tetracyclic binding inhibitor of neuropeptide Y receptors, from Aspergillus niger WB2346. II. Physico-chemical properties and structural characterization J Antibiot 1995 48 10 1060-1065

Rigollier P, Rueger H, Whitebread S, Yamaguchi Y, Chiesi M, Schilling W, Criscione L : Synthesis and SAR of CGP 71683A, a potent and selective antagonist of the neuropeptide Y Y5 receptor. Int Symp Med Chem 1998 15th Edinburgh 239

Criscione L, Rigollier P, Batzl-Hartmann C, Rueger H, Stricker-Krongrad A, et al : Food intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. J Clin Invest 1998 102 12 2136 -2145

Neurogen Corp : NGD 95-1 Clin Trials Monitor 1996 5 10 Ab 18244

Buttle LA : Anti-obesity drugs: on target for huge market sales. Exp Opin Invest Drugs 1996 5 12 1583 -1587

Gehlert DR, Hipskind PA : Neuropeptide Y receptor antagonists in obesity. Exp Opin Invest Drugs 1996 7 9 1827 -1838

Goldstein DJ, Trautmann ME : Treatments for obesity. Emerging Drugs 1997 2 – 1-27

Hipskind P A, Lobb K L, Nixon J A, Britton T C, Bruns R F, Catlow J, Dieckman McGinty D K, Gackenheimer S L, Gitter B D, Iyengar S, Schober D A, et al. : Potent and selective 1,2,3-trisubstituted indole NPY Y-1 antagonists. J Med Chem 1997 40 3712 –3714

Zimmerman DM, Cantrall BE, Smith ECR, Nixon JA, Bruns RF, Gitter B, Hipskind PA, Ornstein PL, Zarrinmayeh H, Britton TC, Schober DA, Gehlert DR: Structure-

activity relationships of a series of 1-substituted-4-methylbenzimidazole neuropeptide Y-1 receptor antagonists Bioorganic Med Chem Lett 1998 8 5 473 –476

Zarrinmayeh H, Nunes A, Ornstein P, Zimmerman D, Arnold MB, et al : Synthesis and evaluation of a series of novel 2-[(4-chlorophenoxy)methyl]benzimidazoles as selectiveneuropeptide Y Y1 receptor antagonists J Med Chem 1998 41 15 2709 – 2719

Britton TC, Spinazze PG, Hipskind PA, Zimmerman DM, Zarrinmayeh H, Schober DA, Gehlert DR, Bruns RF : Structure-activity relationships of a series of benzothiophene-dervied NPY-Y1 antagonists: optimization of the C2 side chain Bioorganic Med Chem Lett 1999 9 3 475 -480

Zarrinmayeh H, Zimmerman DM, Cantrell BE, Schober DA, Bruns RF, Gackenheimer SL, Ornstein PL, Hipskind PA, Britton TC, Gehlert DR : Structure-activity relationship of a series of diaminoalkyl substituted benzimidazole as neuropeptide Y Y1 receptor antagonists Bioorganic Med Chem Lett 1999 9 5 647 -652

Murakami Y, Hara H, Okada T, Hashizume H, Kii M, Ishihara Y, Ishikawa M, Mihara S-I, Kato G, Hanasaki K, Hagishita S, Fujimoto M : 1,3-disubstituted benzazepines as novel, potent, selective neurpeptide Y Y1 receptor antagonists J Med Chem 1999 42 14 2621-2632

Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Beck Sickinger AG, Doods HN : The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur J Pharmacol 1994 271 2-3 R11 -R13

Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Doods HN : Subtype selectivity and antagonbist profile of the nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226 J Pharmacol Exp Ther 1995 275 1 143 –149.

Wright J, Bolton G, Creswell M, Downing D, Georgic L, Heffner T, Hodges J, MacKenzie R, Wise L : 8-amino-6-(arylsulphonyl)-5-nitroquinolones: novel nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonists Bioorganic Med Chem Lett 1996 6 15 1809 -1814

Capurro D, Huidobro-Toro JP : The involvement of neyropeptide Y Y1 receptors in the blood pressure baroreflex:studies with BIBP 3226 and BIB 3304. Eur J Pharmacol 1999 376 3 251 –255

Dumont Y, Cadieux A, Doods H, Quirion R : New tools to investigate neuropeptide Y receptors in the central and peripheral nervous systems: BIBO-3304 (Y1), BIIE-246 (Y2) and [125I]-GR-231118 (Y1/Y4). Soc Neurosci Abstr 1999 25 Part 1 Abs 74.11

Hegde SS, Bonhaus DW, Stanley W, Eglen RM, Moy TM, Loeb M, et al : Pharmacological evaluation of 1229U91, a high affinity and selective neuropeptide Y(NPY) - Y1 receptor antagonist Pharmacol Res 1995 31 190

Matthews JE, Chance WT, Grizzle MK, Heyer D, Daniels AJ : Food intake inhibition and body weight loss in rats treated with GI 264879A, an NPY-Y1 receptor. Soc Neurosci Abstr 1997 23 Pt 2 1346

Doods HN, Willim K-D, Smith SJ : BIBP 3226: a selective and highly potent NPY-Y1 antagonist Proc Br Pharmacol Soc 1994 13-16 Dec. C47

Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Beck Sickinger AG, Doods HN : The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur J Pharmacol 1994 271 2-3 R11 -R13

Serradeil-Le-Gal C, Valette G, Rouby PE, Pellet A, Villanova G, Foulon L, Lespy L, Neliat G, Chambon JP, Maffrand JP, Le-Fur G : SR 120107A and SR 120819A: Two potent and selective, orally-effective antagonists for NPY Y1 receptors Soc Neurosci Abstr 1994 20 Pt 1 907 -Abs 376.14

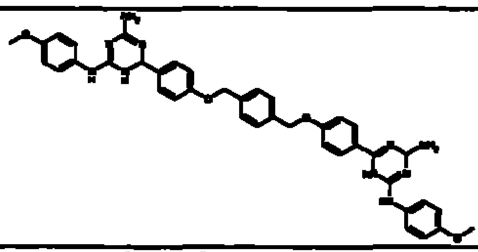
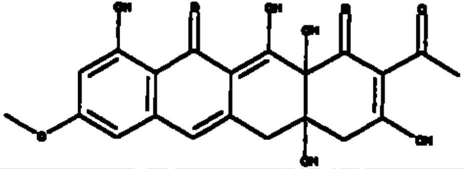
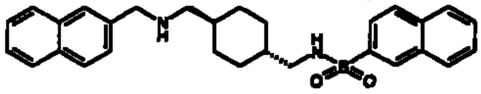
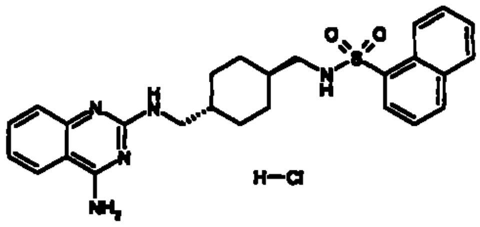
Hong Y, Gregor V, Ling AL, Tompkins EV, Porter J, Chou TS, Paderes G, Peng Z, Hagaman C, Anderes K, Luthin D, May J : Synthesis and biological evaluation of novel guanylurea compounds as potent NPY Y1 receptor antagonist Acs 1999 217 Anaheim MEDI 108

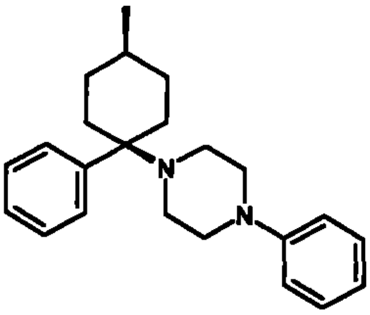
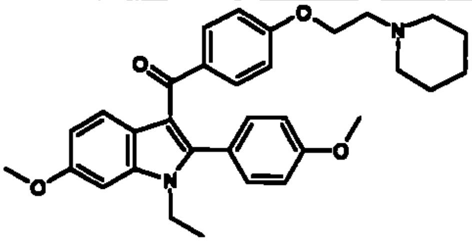
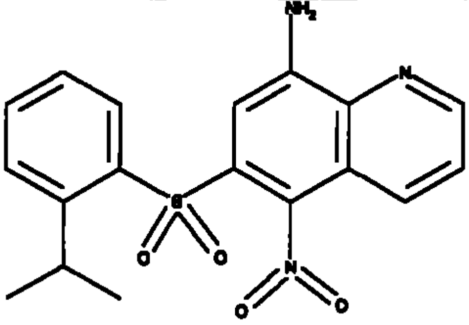
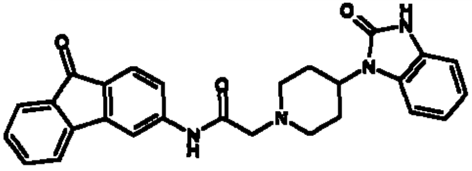
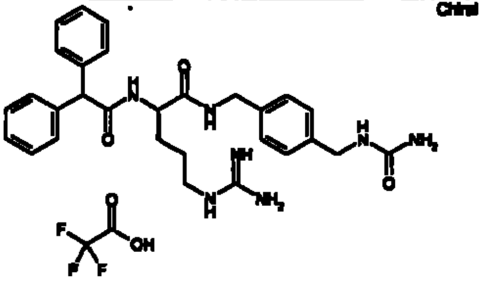
I:NPYs (in particular NPY antagonists) are disclosed in the following documents:

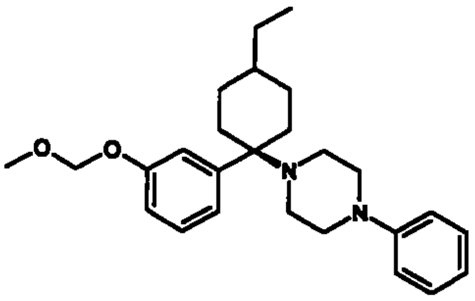
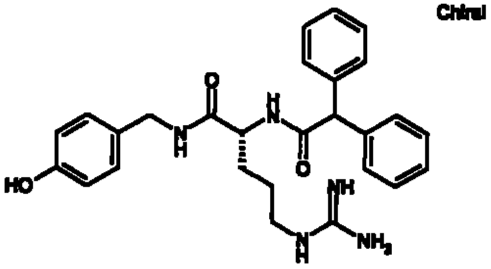
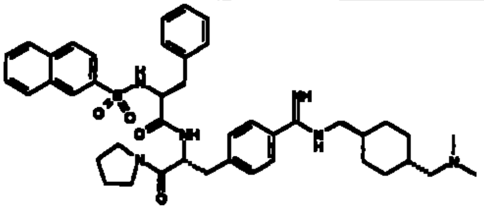
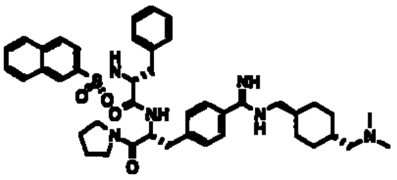
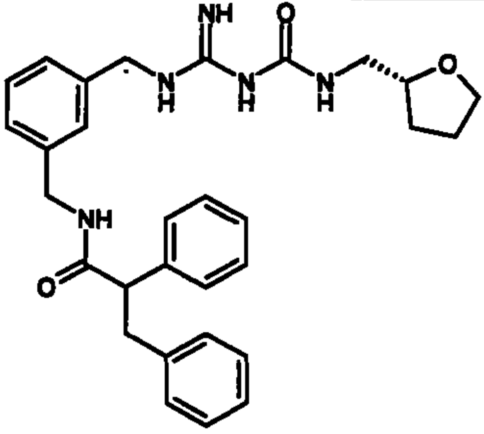
WO-98/07420
WO-94/00486
WO-96/22305
WO-97/20821
WO-97/20822
WO-96/14307
JP-07267988
WO-96/12489
US-5552422
WO-98/35957
WO-96/14307
WO-94/17035
EP-0614911

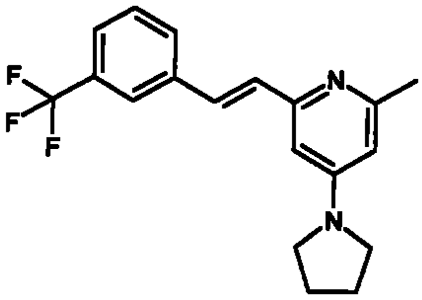
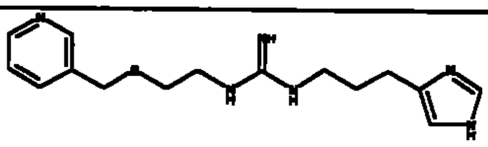
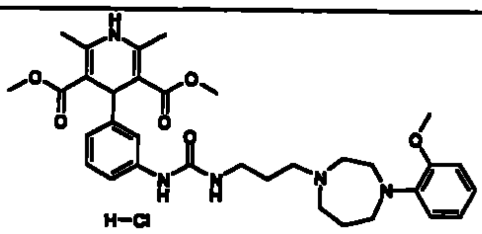
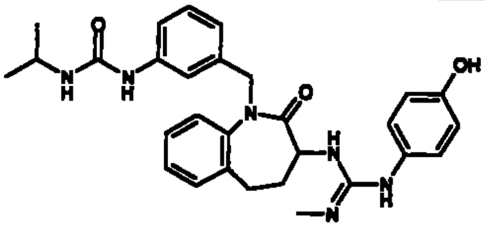
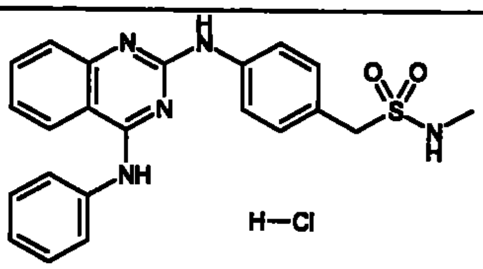
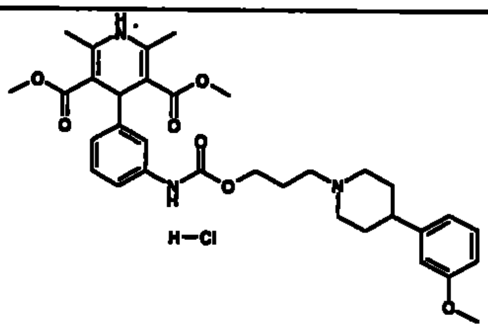
WO-98/40356
EP-0448765
EP-0747356
WO-98/35941
WO-97/46250
EP-0747357

Preferred examples of I:NPYs are selected from the following structures:

| Compound | Structure | Mode of Action<br>References |
|---|---|---|
| | | |
| F34 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/07420<br>Ref 3 |
| F35 |  | I:NPY<br>Ref 5 |
| F36 |  | I:NPY Y5<br>Ref 1, 4 |
| F37 | Ile - Cys- Pro- Cys- Tyr- Arg- Leu- Arg- Tyr- NH2 cyclic (2,2'), (4,4')- disulfide dimer | I:NPY Y1<br>WO-94/00486<br>WO-96/22305<br>Ref 1,2, 23 |
| F38 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/20821<br>WO-97/20822<br>Ref 1, 3, 6, 7 |

| | | |
|---|---|---|
| F39 |  | I:NYP Y1<br>WO-96/14307<br>Ref 1, 8, 9, 10, 11 |
| F40 | | I:NPY Y1<br>JP-07267988<br>Ref 1 |
| F41 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/12489<br>Ref 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |
| F42 |  | I:NPY Y1<br>US-5552422<br>Ref 17, 18, 19, 20 |
| F43 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/35957<br>Ref 3 |
| F44 |  Chiral | I:NPY Y1<br>Ref 21, 22 |

| | | |
|---|---|---|
| F45 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref 3 |
| F46 | ? | I:NPY Y1<br>Ref 24 |
| F47 |  | I:NPY Y1<br>WO-94/17035<br>Ref 3, 17, 25, 26 |
| F47 | | I:NPY Y1<br>Ref 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |
| F48 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27 |
| F49 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27 |
| F50 |  | I:NPY Y1<br>Ref 28 |

| | | |
|---|---|---|
| F51 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/40356 |
| F52 |  | I:NPY<br>EP-0448765 |
| F53 |  H<br>N<br>O<br>O<br>O<br>O<br>O<br>N<br>H<br>N<br>H<br>N<br>N<br>O<br>H—Cl | I:NPY Y1<br>EP-0747356 |
| F54 |  O<br>N<br>H<br>N<br>H<br>N<br>O<br>OH<br>H<br>N<br>N<br>H<br>N | I:NPY Y1<br>WO-98/35941 |
| F55 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/46250 |
| F56 |  H<br>N<br>O<br>O<br>O<br>O<br>O<br>N<br>H<br>O<br>N<br>O<br>H—Cl | I:NPY Y1<br>EP-0747357 |

VIP (vasoactive intestinal peptide)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is VIP or one of its associated receptors. Current classification/nomenclature refers to these as VPAC1, VPAC2 and PACAP.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for VIP and its receptors are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

We have shown that VPAC1and VPAC2 are present in human and rabbit vagina. PACAP was absent from both rabbit and human vagina.

VIP is the major endogenous neurotransmitter released during sexual arousal that is responsible for nerve-induced vaginal vasodilation of the vascular beds located in the vaginal wall. These vasodilatory effects are mediated by adenylate cyclase activation and cAMP production. Without wishing to be bound by theory, this effect may be mediated via VIP receptor subtypes $VPAC_1$, $VPAC_2$ or PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) receptors. $VPAC_2$ and PACAP receptors are not expressed outside of the CNS and the receptors despite being expressed in the pituitary, appears to have no widespread biological function.

The agent of the present invention could potentiate VIP and/or act as a VIP mimetic. The agent would then potentiate and/or mimic the vasorelaxant effects of endogenous VIP released during sexual arousal. The agent may also have an additive effect on VIP-induced relaxations of vaginal smooth muscle. Clinically this will lead to FSAD treatment, though increased vaginal lubrication *via* vaginal wall engorgement and compliance.

A suitable agent may be a VIP analogue.

Background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning VIP has been extracted from that source.

"Vasoactive intestinal peptide (VIP), a 28-amino acid peptide originally isolated from porcine duodenum, is present not only in gastrointestinal tissues but also in neural tissues, possibly as a neurotransmitter, and exhibits a wide variety of biological actions. Because VIP shows similarities to glucagon, secretin and gastric inhibitory peptide (GIP), it has been considered a member of the glucagon-secretin family. The primary translation product of the mRNA encoding VIP (prepro-VIP) has a molecular weight of 20 daltons. By cloning the DNA sequence complementary to the mRNA coding for human VIP, Itoh et al. (1983) found that the VIP precursor contains not only VIP but also a novel peptide of 27 amino acids, designated PHM27, that has aminoterminal histidine and carboxyterminal methionine. It differs from PHI17 isolated from porcine intestine by 2 amino acids; PHI27, as its designation indicates, has carboxyterminal isoleucine. Linder et al. (1987) isolated the human gene for VIP and PHM27 and studied its expression in various tissues of the rat. Heinz-Erian et al. (1985) suggested that deficient innovation of sweat glands of cystic fibrosis patients by the VIP neuropeptide might be a basic mechanism for the decreased water content and relative impermeability of the epithelium to chloride and other ions that characterize cystic fibrosis. To test this hypothesis, Gozes et al. (1987) took the 'candidate gene' approach. Bodner et al. (1985) had shown that VIP and PHM-27 are encoded by adjacent exons. Gozes et al. (1987) used the PHM-27-encoding genomic fragment to detect the presence of the VIP gene at 6q21-qter. Thus, they eliminated a defective VIP gene as a candidate for the primary cause of cystic fibrosis (which is coded by chromosome 7). By in situ hybridization techniques, Gozes et al. (1987) assigned the VIP gene to 6q24. This placed VIP in the region of MYB (189990), which has been mapped to 6q22. Gozes et al. (1987) investigated a functional relationship between the 2 genes in neuronal tissue. They observed a sharp peak of MYB mRNA in the hippocampus of 3-day-old rats, preceding the peak of VIP mRNA that occurs in this area at 8 days of age. Omary and Kagnoff (1987) found nuclear receptors for VIP in a human colonic adenocarcinoma cell line. Gotoh et al. (1988) assigned VIP to chromosome 6 by spot blot hybridization of a molecularly cloned fragment of the gene to sorted chromosomes. The localization was refined to 6q26-q27 by in situ hybridization."

As indicated, background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning VIPR1 or VPAC1 has been extracted from that source.

"Vasoactive intestinal peptide (VIP; 192320) is an octacosameric neuroendocrine mediator found predominantly in cholinergic presynaptic neurons of the central nervous system and in peripheral peptidergic neurons innervating diverse tissues. Of the many neuroendocrine peptides with immunologic functions, VIP is distinguished by its capacity to affect both B and T cells directly. Distinct subsets of neural, respiratory, gastrointestinal, and immune cells bear specific high-affinity receptors for VIP, which are associated with a guanine nucleotide-binding (G) protein capable of activating adenylate cyclase. Libert et al. (1991) obtained 4 new receptors of the G protein-coupled receptor family by selective amplification and cloning from thyroid cDNA. One of these, termed RDC1, was identified as the VIP receptor by Sreedharan et al. (1991). Libert et al. (1991) mapped the VIPR gene to 2q37 by in situ hybridization. Later information made it doubtful that the gene mapped to 2q37 was in fact the VIP receptor gene (Vassart, 1992). The sequence that was designated GPRN1 by Sreedharan et al. (1991) and mapped to 2q37 was found not to bind VIP by Wenger (1993). Sreedharan et al. (1995) isolated an authentic type I VIP receptor gene and by fluorescence in situ hybridization localized it to the 3p22 band in a region associated with small-cell lung cancer. By interspecific backcross analysis, Hashimoto et al. (1999) mapped the mouse Vipr1 gene to the distal region of chromosome 9, a region that shows homology of synteny with human chromosome 3p. Sreedharan et al. (1993) cloned a human intestinal VIP receptor gene; the deduced amino acid sequence shares 84% identity with the rat lung VIP receptor. Couvineau et al. (1994) isolated 2 VIPR cDNA clones from a human jejunal epithelial cell cDNA library. One encodes a VIP receptor consisting of 460 amino acids and having 7 putative transmembrane domains, as do other G protein-coupled receptors. The other encodes a 495-amino acid VIP receptor-related protein exhibiting 100% homology with the functional VIP receptor over the 428 amino acids at the C-terminal region, but containing a completely divergent 67-amino acid N-terminal domain. When expressed in COS-7 cells, the second protein did not bind radioiodinated VIP, although it was normally addressed at the plasma membrane as assessed by immunofluorescence studies. The type I VIP receptor, also termed type II PACAP receptor (see 102981 for another type of PACAP receptor), was found by Sreedharan et al. (1995) to span approximately 22 kb and to be comprised of 13 exons (ranging from 42 to 1,400 bp) and 12 introns (ranging from 0.3 to 6.1 kb). Sreedharan et al. (1995) also characterized the promoter and the 5-prime flanking region of the gene."

As indicated, background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning VIPR2 or VPAC2 has been extracted from that source.

> "Vasoactive intestinal peptide (VIP; 192320) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP; 102980) are homologous peptides that function as neurotransmitters and neuroendocrine hormones. While the receptors for VIP and PACAP share homology, they differ in their substrate specificities and expression patterns. See VIPR1 (192321) and ADCYAP1R1(102981). Svoboda et al. (1994) performed low stringency PCR using primers based on sequences conserved among VIP receptors. They cloned the human VIP2 receptor gene from a lymphoblast cDNA library. This gene encoded a 438-amino acid polypeptide that shares 86% identity with the rat VIP2 receptor. They expressed the human VIP2 receptor in Chinese hamster ovary cells and found that it binds to PACAP-38, PACAP-27, VIP, and helodermin, and that binding of the receptor to any of these peptides activates adenylate cyclase. Peptide binding was found to be inhibited by GTP. Adamou et al. (1995) cloned the VIP2 receptor gene from a human placenta cDNA library. Northern blotting revealed that VIPR2 is expressed as 2 transcripts of 4.6 kb and 2.3 kb at high levels in skeletal muscle and at lower levels in heart, brain, placenta, and pancreas. Mackay et al. (1996) used fluorescence in situ hybridization to map the VIPR2 gene to human chromosome 7q36.3. Further mapping with cell lines derived from patients with holoprosencephaly type 3 (HPE3; 142945) revealed that the VIPR2 gene lies within the HPE3 minimal critical region. Mackay et al. (1996) stated that although VIPR2 may contribute to the HPE3 phenotype, it is not the sole factor responsible."

AC (adenylate cyclase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is AC.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for AC are available in the literature.

To confirm that VIP induces vasorelaxation via elevation of intracellular cAMP levels and consequent activation of adenylate cyclase we have measured vaginal cAMP concentrations during VIP stimulation and used forskolin, an adenylate cyclase activator, to mimic the effects of activating the cAMP/adenylate cyclase pathway.

In these studies, we found that VIP treatment and forskolin treatment elevate intracellular concentrations cAMP in isolated vaginal tissue.

We also found that forskolin increases vaginal blood flow in an animal model of sexual arousal.

Additionally we found that forskolin induces relaxation in isolated vagina.

Background teachings on AC are presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning AC has been extracted from that source.

> "Adenylyl cyclase (EC 4.6.1.1 ) catalyzes the transformation of ATP into cyclic AMP. The enzymatic activity is under the control of several hormones, and different polypeptides participate in the transduction of the signal from the receptor to the catalytic moiety. Stimulatory or inhibitory receptors (Rs and Ri) interact with G proteins (Gs and Gi) that exhibit GTPase activity and they modulate the activity of the catalytic subunit of the adenylyl cyclase. Parma et al. (1991) cloned a cDNA corresponding to human brain adenylyl cyclase, symbolized by them as HBAC1. By in situ hybridization to metaphase chromosomal spreads using the human brain cDNA probe, Stengel et al. (1992) showed that the gene is located on 8q24.2. A highly homologous gene, ADCY2 (103071), was assigned to 5p15.3 by the same method."

## GENERAL RECOMBINANT DNA METHODOLOGY TECHNIQUES

Although in general the techniques mentioned herein are well known in the art, reference may be made in particular to Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) and Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. PCR is described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188.

## SUMMARY

In summation, the present invention relates to:

1. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

2. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD.

3. A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

4. An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In other embodiments, the present invention relates to:

5. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; wherein the agent is selected from any one or more of:

a cAMP mimetic

I:PDE$_{\text{cAMP}}$

I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

6. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is selected from any one or more of:

a cAMP mimetic
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

7. A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD, wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient, wherein the agent is selected from any one or more of:
a cAMP mimetic

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$
P$_{cAMP}$.

8. An assay method for identifying an agent that treat a female suffering from FSD, in particular FSAD, the assay method comprising determining whether or not a putative agent is capable of acting as any one or more of:

a cAMP mimetic
I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$
P$_{cAMP}$

wherein if the putative agent is capable of acting as any one or more of

a cAMP mimetic
I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

$P_{cAMP}$

then the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In other embodiments, the present invention relates to:

9. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing vaginal blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

10. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing vaginal blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female.

11. A method of treating a female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the female so as to cause enhanced vaginal blood flow.

## EXAMPLES

The present invention will now be described, by way of example only, in which reference is made to the following Figures:

Figure 1 which is a graph;
Figure 2 which is a graph;
Figure 3 which is a graph;
Figure 4 which is a graph;
Figure 5 which is a graph;
Figure 6 which is a graph;
Figure 7 which is a graph;
Figure 8 which is a graph;
Figure 9 which is a graph; and
Figure 10 which is a graph.

In more detail:

Figure 1:- Electrical stimulation of the pelvic nerve induces a frequency-dependent increase in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Increasing the stimulation frequency induces larger increases in blood flow. Changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 2:- Vasoactive intestinal peptide (VIP)-induces increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Figure 2a illustrates how vaginal blood flow is increased in a concentration dependent manner by infusions of VIP (intravenous bolus). Figure 2b demonstrates that 2 repetitive infusions of VIP produce similar increases in blood flow. Note the duration of the response is also similar. All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 3:- Vasoactive intestinal peptide (VIP) reduces the mean arterial blood pressure in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. This graph illustrates the *typical* effects of the vasoactive agents and stimulation parameters used to investigate vagina blood flow on mean arterial pressure in an anaesthetised rabbit. These observed effects are typical of the trends seen in all animals tested. VIP induced a significant depression of mean arterial pressure whereas pelvic nerve stimulation, control infusions of Hepsaline or inhibitors of $PDE_{cAMP}$ or NEP have no

effect on blood pressure. Note, the reduction in blood pressure associated with VIP infusions is also associated with a large increase in heart rate.

Figure 4:- Activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway mimics VIP mediated vasorelaxation and smooth muscle relaxation in vaginal tissue. Figure 4a illustrates that an infusion of forskolin (40nmol/kg *iv* bolus, a cAMPmimetic) induces significant increases in vaginal blood flow. Note the amplitude and duration of the response is similar to that induced by VIP (1.0μg/kg, *iv* bolus). Interestingly, the effects on blood flow have a longer duration of action on the external vaginal wall. All changes were monitored using laser Doppler technologies. Figure 4b demonstrates that both VIP (0.1μM) and forskolin (10μM) significantly elevate intracellular concentrations of cAMP above basal levels in the rabbit vagina. Figure 4c shows that forskolin induces potent relaxations of precontracted (1μM phenylephrine) rabbit vaginal strips with an $IC_{50}$~300nM. All changes were quantified using *in vivo* laser Doppler technologies, biochemical cAMP enzyme immunoassay or by *in vitro* tissue relaxation.

Figure 5:- A selective inhibitor of NEP EC 3.4.24.11 enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive PNS at 15 minute intervals induces reproducible increases in vaginal blood flow (White bar). Administration of a NEP inhibitor (Grey bar) enhanced the peak increase in vaginal blood flow induced by submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz) compared to increases observed during time matched control stimulations or vehical controls (Hatched bar). The following dose dependant enhancements were observed - 0.3mg/kg iv induced a 40% increase and 1.0mg/kg iv induced a 91% increase (mean n=3). The NEP inhibitor had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow (Data not shown). All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 6:- Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive infusions of VIP at 30 minute intervals induce reproducible increases in vaginal blood flow (See figure 2b). An NEP inhibitor both potentiates the amplitude and prolongs the duration of enhanced blood flow when these increases are induced by submaximal doses of VIP e.g. 0.3μg/kg. At doses of VIP which induce maximal increases in vaginal blood flow eg 3μg/kg, NEP inhibitors only potentiate the duration of enhanced vaginal blood flow. VIP-induced increase in the presence of a NEP

inhibitor are shown as closed triangles whereas control VIP responses are shown as open triangles. A control infusion of Hepsaline has no effect on the amplitude of the responses. All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 7:- A selective inhibitor of $PDE_{cAMP}$ type 2 enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive PNS at 15 minute intervals induces reproducible increases in vaginal blood flow (White squares). Administration of a $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor enhanced the peak increase in vaginal blood flow induced by submaximal stimulation frequencies (Black squares; at 4Hz) compared to increases observed during time matched control stimulations (Open squares). An infusion of the PDE2 inhibitor (500µg/kg) induced a 86.8±21.9% enhancement in vaginal blood flow (mean±sem n=2). All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 8:- Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ type 2 enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive infusions of VIP at 30 minute intervals induce reproducible increases in vaginal blood flow (See figure 2b). A selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor (25µg/kg *iv* bolus) potentiates the duration of enhanced vaginal blood flow induced by VIP (3µg/kg *iv* bolus). VIP-induced increases in the presence of a $PDE_{cAMP}$ inhibitor are shown as closed triangles whereas control VIP responses are shown as open triangles. A control infusion of Hepsaline had no effect on the amplitude of the responses. All changes were monitored using Laser Doppler technologies.

Figure 9:- A selective antagonist of NPY Y1 receptors enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive PNS at 15 minute intervals induces reproducible increases in vaginal blood flow (data not shown). Administration of a NPY Y1 antagonist (Grey bar) enhanced the peak increase in vaginal blood flow induced by submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz) compared to increases observed during time matched control stimulations or in vehicle controls (Hatched bar). The following dose dependant enhancements were observed - 0.01mg/kg iv induced a 15.8±19.6% increase; 0.03mg/kg iv induced a 35.1±17.17% increase; 0.10mg/kg iv induced a 60.1±16.9% increase and 0.3mg/kg iv induced a 91.9±27.4% increase (mean±sem n=3). The NPY Y1 antagonist had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow (Data not shown). All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 10 provides a summary graph for some of the data provided herein showing that the agents of the present invention are very useful in increasing vaginal blood flow by potentiating endogenous cAMP levels.

## AN ASSAY FOR MEASURING cAMP ACTIVITY/LEVELS

Measurement of cAMP from vaginal tissue samples using a Biotrak cAMP Enzymeimmunoassay (EIA) kit (Amersham Life Sciences RPN 225).

cAMP levels are measured by EIA in vaginal tissue samples. The EIA is based on competition between unlabelled cAMP and a fixed quantity of peroxidase labelled cAMP for a limited amount of cAMP specific antibody.

## 1. MATERIALS

All materials are supplied by Amersham Life Science cAMP EIA kit (RPN 225) unless otherwise stated.

1.1 Microtitre plate - 96 well plate coated with donkey anti-rabbit IgG.

1.2 Assay buffer - 0.05M sodium acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. The contents of the bottle are transferred to a graduated cylinder using 3x15ml distilled water washes. The final volume is then adjusted to 500ml.

1.3 cAMP standard (for acetylation method). cAMP at 10.24pmol/ml in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Standard is dissolved in 2.5ml of assay buffer for use.

1.4 Antiserum. Anti-cAMP antibody in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Prior to use, antibody is diluted with 11ml assay buffer and mixed by gentle inversion to dissolve contents.

1.5 cAMP conjugate. cAMP horseradish peroxidase in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Prior to use, solution is diluted with 11ml assay buffer and mixed by gentle inversion to dissolve contents.

1.6 Wash buffer. 0.01M phosphate buffer pH7.5 containing 0.05% (v/v) Tween™ 20 upon reconstitution. The contents of the bottle are transferred to a graduated cylinder using 3x15ml distilled water washes. The final volume is then adjusted to 500ml.

1.7 TMB substrate. 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine (TMB)/ hydrogen peroxide, in 20% (v/v) dimethylformamide.
Ready for use.

1.8 Acetylation reagent. 2ml acetic anhydride, 4ml triethylamine, prepared as required.

1.9 Sulphuric acid (1M). 1M Sulphuric acid is prepared from an 18M stock (BDH). 1.11ml of acid is added to 18.8ml of distilled water, this provides enough for one plate.

## 2. SPECIFIC EQUIPMENT

2.1 Disposable 5ml glass test tubes
2.2 Spectrophotometric plate reader (Spectra max 190)
2.3 Microtitre plate shaker (Luckham R100)

## 3. METHODS

- Tissue sample preparation. The tissues were treated with the relevant pretreatment in 5ml samples of physiological salt solution eg agonists, cAMPmimetics etc. After treatment the samples were snap frozen in liquid nitrogen and then smashed using a hammer. The powder was scraped into a centrifuge tube and 1ml of 0.5M ice cold perchloric acid (PCA) was added. The sample was vortex mixed and left on ice for 1hr.
- cAMP extraction from tissue samples. The samples were centrifuged at 10000g for 5 min at 4°C. The supernatant was removed and placed in other centrifuge tubes. The pellet was keep for protein analysis at -80°C. The supernatant samples were then neutralised to pH~6 using $K_3PO_4$. Centrifuged at 10000g for 5 min at 4°C. Recover supernatant and wash 4 times with 5 volumes (5ml) of water saturated diethyl ether. The upper ether layer should be discarded after each wash. Transfer aqueous to into a short thin glass tube and dry under a steam of nitrogen at 60°C. Dissolve dried extract in 1ml of assay buffer and store in refrigerator until required (or can be frozen).
- Stock reagents are equilibrated to room temperature and working solutions then prepared
- cAMP standards are prepared in glass tubes labelled 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, and 512fmol. This is achieved by adding 1ml of assay buffer to all tubes except the 512fmol standard. 1ml of acetylation standard (10.24pmol/ml) is then added to the two top standards (256, and 512fmol). The 256fmol standard is vortexed and 1ml transferred to the 128fmol standard. his is continued until the 2fmol standard where 1ml of solution is disposed of. A zero standard tube is set up containing 1ml of assay buffer.
- Tissue extract samples are thawed on ice (if necessary) and diluted 1 in 100 (10µl sample to 990µl assay buffer) in labelled glass tubes.

- The cAMP in all standards and samples is acetylated by the addition of 100µl of acetylation reagent in a fume hood which is added down the side of the tube before immediately vortexing.
- 50µl of all standards and samples are added to the appropriate wells of the 96 well plate, and 150µl of assay buffer is added to non specific binding (NSB) wells.
- 100µl of antiserum is added to all wells except blanks (B) and NSB before incubating for 2 hours at 3-5°C.
- After incubation, 100µl of cAMP-peroxidase conjugate is added to all wells except B before a further 1 hour incubation at 3-5°C.
- Plates are emptied by turning them upside down and blotting onto absorbent paper before washing each well four times with 400µl of wash buffer. After each wash plates are re-blotted to ensure any residual wash buffer is removed. 200µl TMB is then immediately dispensed into all wells.
- Plates are put on a plate shaker for 30 minutes at room temperature before the addition of 100µl of 1M sulphuric acid into all wells. The optical density is read on Spectra max 190 at 450nm within 30 minutes.

## 4. STANDARDS

With each assay the following standard tubes are set up:-

### 4.1 Spiking a standard in assay buffer

A known amount of cAMP is spiked into assay buffer to determine the efficiency of the assay. 70pmol/ml of cAMP is added to assay buffer which is equivalent to 35fmol/well in the assay, which is in the middle of the dose response curve.

| | |
|---|---|
| To make up 1ml of standard:- | 68.4µl 521fmol/well standard |
| | 931.6µl Assay buffer |

4. Effects of compounds on plate

Standards are set up to determine whether the compound used in the functionalstudies has any effect on the 96 well plate or affects the binding of cAMP. These include:-

- Spiking the compound into assay buffer alone to assess the effects of the compound directly on the plate.
- Spiking the compound into plasma containing basal levels of cAMP to assess the effects of the compound on the binding of cAMP to the plate.

5nM concentrations of compound are spiked into each standard. 5nM is chosen because total drug levels at the end of infusion have in the past been approximately 150-300nM. Samples are diluted 1:100 before being assayed, therefore 5nM allows for any larger than expected total drug concentrations at the end of infusion.

5. CALCULATIONS

The Spectra max plate reader reads the optical density (OD) at 450nm.

The standard curve is generated by plotting the %B/Bo (y axis) against cAMP fmol/well (x axis) on Spectra max.

%B/B0 (% bound) for each sample and standard is calculated as follows:-
Bo = zero standard (see methods 3.2)

$$\%B/Bo = \frac{(\text{standard or sample OD-NSB OD})}{(\text{Bo OD-NSB OD})} \times 100$$

The fmol/well volume can then be read directly from the standard curve for each sample. Values are then converted to pmol/ml before taking the mean of each pair of samples.

Conversion of values from fmol/well to pmol/ml:-

fmol to pmol = divide by 1000
Volume in well = 50µl .... So (x1000)
50
Sample is diluted 1/100, so overall = 1 x 1000/1000 x 100/50 = 2

So all fmol/well values are multiplied by 2 to give pmol/ml

## ANIMAL TEST MODEL

## POTENTIATING THE EFFECTS OF CYCLIC ADENOSINE-3',5'-MONOPHOSPHATE (cAMP) RESULTS IN INCREASES IN VAGINAL BLOOD FLOW IN THE ANAESTHETISED RABBIT MODEL OF SEXUAL AROUSAL

### 1.0 Aims

1. To develop and validate an animal model of female sexual arousal.
2. To identify the mechanism(s) responsible for the regulation of vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit.
3. To identify potential approaches for enhancement of vaginal blood flow.
4. To investigate the mechanism(s) that underlie relaxation of vaginal smooth muscle and to identify potential approaches for enhancement of vaginal relaxation.

### 2.0 Introduction

The *normal* sexual arousal response consists of a number of physiological responses that are observed during sexual excitement. These changes such as vaginal, labial and clitoral engorgement result from increases in genital blood flow. Engorgement leads to increased vaginal lubrication via plasma transudation; increased vaginal compliance (relaxation of vaginal smooth muscle) and increases in vaginal and clitoral sensitivity.

Female sexual arousal disorder (FSAD) is a highly prevalent sexual disorder affecting up to 40% of pre-, peri- and postmenopausal (±HRT) women. The primary consequence of FSAD is reduced vaginal engorgement or swelling which manifests itself as a lack of lubrication and a lack of pleasurable genital sensation. Secondary consequences include reduced sexual desire, pain during intercourse and difficulty in achieving orgasm. The most common cause of FSAD is decreased genital blood flow resulting in reduced vaginal, labial and clitoral engorgement. (Park, 1997; Goldstein, 1998; Berman, 1999a, Werbin, 1999).

As explained herein, the present invention provides a means for restoring or mimicing the normal sexual arousal response in women suffering from FSAD, by enhancing genital blood flow.

In our studies, we have identified cAMP (cyclic adenosine-3',5'-monophosphate) as the mediator of vaginal vasorelaxation using laser Doppler technology to measure small changes in genital blood flow. This has involved developing an animal model of sexual arousal and demonstrating that the data mimics the physiological changes observed during female sexual arousal. The model has then used to identify and validate mechanisms that enhance genital blood flow eg. direct or indirect potentiation of cAMP-mediated vasorelaxation.

## 3.0 Methods

### *3.1 Anaesthetic Protocol*

Female New Zealand rabbits (~2.5kg) were pre-medicated with a combination of Medetomidine (Domitor®) 0.5ml/kg *i.m.*, and Ketamine (Vetalar®) 0.25ml/kg *i.m.* whilst maintaining oxygen intake via a face mask. The rabbits were tracheotomised using a Portex™ uncuffed endotracheal tube 3 ID., connected to ventilator and maintained a ventilation rate of 30-40 breaths per minute, with an approximate tidal volume of 18-20 ml, and a maximum airway pressure of 10 cm $H_2O$. Anaesthesia was then switched to Isoflurane and ventilation continued with $O_2$ at 2l/min. The right marginal ear vein was cannulated using a 23G or 24G catheter, and Lactated Ringer perfused at 0.5ml/min. The rabbit was maintained at 3% Isoflurane during invasive surgery, dropping to 2% for maintenance anaesthesia.

### 3.2 *Cannulation of Vessels*

The left groin area of the rabbit was shaved and a vertical incision was made approximately 5cm in length along the thigh. The femoral vein and artery were exposed, isolated and then cannulated with a PVC catheter (17G) for the infusion of drugs and compounds. Cannulation was repeated for the femoral artery, inserting the catheter to a depth of 10cm to ensure that the catheter reached the abdominal aorta. This arterial catheter was linked to a Gould system to record blood pressure. Samples for blood gas analysis were also be taken via the arterial catheter. Systolic and diastolic pressures were measured, and the mean arterial pressure calculated using the formula (diastolic x2 + systolic) +3. Heart rate was measured via the pulse oxymeter and *Poh-Ne-Mah* data acquisition software system (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems Inc.).

### 3.3 *Stimulation of the Pelvic Nerve*

A ventral midline incision was made into the abdominal cavity. The incision was about 5cm in length just above the pubis. The fat and muscle was *bluntly* dissected away to reveal the hypogastric nerve which runs down the body cavity. It was desirable to keep close to the side curve of the pubis wall in order to avoid damaging the femoral vein and artery which lie above the pubis. The sciatic and pelvic nerves lie deeper and were located after further dissection on the dorsal side of the rabbit. Once the sciatic nerve is identified, the pelvic nerve was easily located. We found that stimulation of the nerve causes an increase in vaginal blood flow, and innervation of the pelvic region. The pelvic nerve was freed away from surrounding tissue and a *Harvard* bipolar stimulating electrode was placed around the nerve. The nerve was slightly lifted to give some tension, then the electrode was secured in position. Approximately 1ml of light paraffin oil was placed around the nerve and electrode. This acts as a protective lubrication to the nerve and prevents blood contamination of the electrode. The electrode was connected to a *Grass* S88 Stimulator. The pelvic nerve was stimulated using the following parameters:- 20V, pulse width 0.5ms, duration of stimulus 10 seconds and a frequency range of 2 to 16Hz. Reproducible responses were obtained when the nerve was stimulated every 15-20 minutes.

A frequency response curve was determined at the start of each experiment in order to determine the optimum frequency to use as a sub-maximal response, normally 4Hz. The compound(s) to be tested were infused, via the femoral vein, using a *Harvard* 22 infusion pump allowing a continuous 15 minute stimulation cycle.

### 3.4 *Positioning of the Laser Doppler Probes*

A ventral midline incision was made, at the caudal end of the pubis, to expose the pubic area. The external vaginal wall was exposed by removing any connective tissue. One laser Doppler flow probe was inserted 3cm into the vagina, so that half the probe shaft is still visible. The position of these probes was then adjusted until a signal was obtained. A second probe was placed just above the surface of a blood vessel on the external vaginal wall. Both probes were clamped in position.

Vaginal blood flow was recorded either as numbers directly from the Flowmeter using *Poh-Ne-Mah* data acquisition software system (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems Inc.) or indirectly from Gould chart recorder trace. Calibration is set at the beginning of the experiment (0-62.5ml/min/100g tissue).

### 3.5 *Infusion of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)*

The doses of VIP (Bachem, H-3775) infused were 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 µg/kg *iv.* and were infused in a volume of 0.5 ml of saline. VIP was infused using a Harvard 22 pump, infusing at 500µl/min via a 3-way tap into the femoral vein. After VIP infusion, the catheter was flushed with heparinised saline (Hepsaline) so that no VIP was left in the catheter.

For experiments using VIP infusions, there was a need for an initial sensitising dose (10nM), in order that reproducible responses could be obtained. An initial infusion of Hepsaline (50UI/ml) was infused to act as a negative control.

### 3.6 *Infusion of Inhibitors*

NEP (Neutral Endopeptidase EC3.4.24.11) inhibitors, phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors and NPY Y1 antagonists were made up in saline or 5% glucose solution (200µl 50% glucose in 1.8ml water for injection). PDE2 inhibitors were disolved in a 40% ethanol solution (200µl 50% glucose in 1.8ml water/ethanol for injection). The inhibitors and vehicle controls were infused at the same rate as VIP. NEP inhibitors were left for 30 minutes prior to a VIP dose response curve, whilst NEP inhibitors, NPY Y1 anatgonists and PDE inhibitors were left for 15 minutes prior to pelvic nerve stimulation.

### 3.7 *Measurement of smooth muscle relaxation in isolated rabbit vagina*

3.7 (a). Rabbit vagina *in vitro* preparation:- Female New Zealand white rabbits (2.0 - 3.0 kg) were killed by cervical dislocation. The abdominal cavity was opened and the vagina excised. Tissue strips were mounted longitudinally in Wesley Co. 5ml silanised organ chambers with braided silk sutures (6/0 gauge) at an initial resting tension of 1.5g in Krebs bicarbonate buffer maintained at 37°C and gassed with 95%$O_2$/5%$CO_2$. The upper ligature of each tissue strip was attached to a 10g capacity force-displacement transducer and changes in isometric force were measured and recorded using a DART *in vitro* data capture system. Tissues were allowed to equilibrate for 1.5 hours and were regularly washed with Krebs.

3.7 (b). Vasoactive intestinal peptide-induced relaxation of rabbit vagina:- Each tissue was contracted using 1µM bath concentration of phenylephrine. When the contractile response reached a stable plateau (~15 minutes), VIP was cumulatively added to the organ chamber at log units to produce concentrations from 0.1 - 100nM. The relaxation responses were measured 5 minutes after the addition of each concentration of VIP; maximum relaxation was achieved by this time. Tissues then received either a test agent (eg NEP or PDE inhibitor) or DMSO vehicle (time matched control).

3.7 (c). Analysis of data for VIP relaxation experiments:- For each VIP concentration relaxation-response curve, the relaxation responses induced by VIP were expressed as a percentage of the maximum phenylephrine induced contraction. These values were then plotted against log VIP concentration and sigmoidal curves were fitted.

For the purpose of curve fitting the minimum relaxation response was constrained to 0 % and the maximum relaxation response was allowed to free fit. The concentration of VIP required to produce 50 % relaxation of the phenylephrine contraction ($EC_{50\ PE}$) was determined.

3.7 (d). Electrical field stimulated relaxation of rabbit vagina:- Rabbit vaginal strips were prepared as described in Section 3.7 (a). The tissue strips were mounted between two platinum electrodes placed at the top and bottom of the organ chamber approximately 4cm apart. Each tissue was contracted using 1µM bath concentration of phenylephrine. When the contractile response reached a stable plateau (15 minutes), the tissues underwent a pre-treatment electrical field stimulated (EFS) induced relaxation curve. This was performed between 40 - 60 volts using sequential frequencies of 2, 4, 8 and 16 Hz delivered as 10 second trains of 0.5 milli second pulse width. The tissues were allowed to return to base line pre-contractile tension between each frequency (5 minutes) and the size of the relaxation response recorded.

After completion of the pre-treatment EFS response curve, all tissues were washed for 15 minutes, allowing the tissues to return to the baseline tension. Tissues then received either a test agent (eg NEP or PDE inhibitor, nitric oxide synthase [NOS] inhibitor) or DMSO vehicle (time matched control). Tissues were re-contracted with phenylephrine (1µM) 15 minutes after the addition of compound or vehicle and an EFS-induced relaxation response curve determined as described above.

For EFS experiments the Krebs was supplemented with atropine (10µM) and guanethidine (150µM) to abolish any cholinergic or adrenergic neuronal innervations of the vagina.

### *3.8 Measurement of cAMP levels in isolated rabbit vagina*

Measurement of cAMP concentrations were made from vaginal tissue extracts using a Biotrak cAMP Enzyme immunoassay (EIA) kit (Amersham Life Sciences RPN 225). Isolated vaginal tissue samples were treated with test agents (eg forskolin or VIP). After 5 minutes the samples were snap frozen using liquid nitrogen, homogenised and cAMP was extracted. cAMP levels are measured by EIA. The EIA is based on

1087

competition between unlabelled cAMP and a fixed quantity of peroxidase labelled cAMP for a limited amount of cAMP specific antibody.

### *3.8 Measurement of phosphodiesterase (PDE) activity in isolated rabbit vagina*

Human vaginal wall cytosol extracts were obtained from ABS Inc., Delaware (Age of donors 41 and 60 years old). The PDE isoenzymes were separated by Mono-Q anion exchange chromatography and characterised based upon their substrate selectivity, sensitivity to allosteric modulators and selective inhibitors. Western analysis using specific PDE isoenzyme antibodies was also performed to detect PDE expression in the human vagina.

All data are reported as mean ± s.e.m. Significant changes were identified using Student's t-tests.

## 4.0 Results and Discussion

### *4.1 Animal model of sexual arousal*

In our studies, we have developed a robust reproducible model of the physiology of sexual arousal. Using this anaesthetised rabbit model, we are capable of measuring small changes in vaginal blood flow using Laser Doppler technology. Stimulation of the pelvic nerve is used to simulate the neuronal effects of sexual arousal.

We found that stimulation of the pelvic nerve induces frequency-dependent increases in vaginal blood flow (See Figure 1). These increases are significant when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall. Stimulation of the pelvic nerve at 2Hz induced a mean maximum blood flow elevation of 10.3±1.8, at 4Hz 20.0±4.6, 8Hz 36.3±4.8 and 16Hz 46.6+4.7 ml/min/100g tissue (n=4); 15-20V, 0.5ms, 10s). These values are of similar amplitude to those previously observed in human studies and animal models of arousal (Berman, 1999a; Park, 1997).

We found that submaximal stimulation of the pelvic nerve results in reproducible increases in vaginal blood flow (eg stimulating 4Hz every 15 minutes gave a mean increase of 8.50±0.10ml/min/100g tissue n=8). This reproducibility is maintained for up to 5 hours. We can use the reproducibility of these responses to investigate a.) the identity of endogenous vasoactive agents/mechanisms which mediate vaginal engorgement, and b.) the influence of drugs which may be efficacious in enhancing vaginal blood flow.

We found that there are no adverse cardiovascular effects associated with pelvic nerve stimulation in the anaesthetised rabbit (See Figure 3).

Vaginal blood flow is increased during sexual arousal (Berman, 1999) via an increased arterial blood supply - the vaginal artery, the vaginal branch of the uterine artery, the internal pudendal artery and the middle branches of the middle rectal artery are all involved in supplying blood to the vagina. The pelvic nerve which originates from S2/S4 spinal regions, innervates the lower vagina and related blood vessels. By stimulating the pelvic nerve we can mimic the blood flow effects observed during sexual arousal i.e. an increase in arterial vaginal blood flow. Interestingly, the increased arterial blood flow is not mirrored by venous drainage allowing the capillary networks to become engorged with blood. Vaginal engorgement leads to vaginal lubrication, via increased plasma transudation and this is one of the first pelvic responses observed during sexual stimulation. The neurotransmitters that are released upon pelvic nerve stimulation or during sexual arousal are currently unidentified. Nerves containing neuropeptides and other neurotransmitter candidates that innervate the vasculature and microvasculature of the vagina have been identified immunohistochemically. These studies indicate that calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NPY), nitric oxide synthase (NOS), substance P and vasoactive intestinal peptide (VIP) are all present in the nerves that innervate the human vagina (Hoyle, 1996).

### 4.2 *Validation of the anaesthetised rabbit model of sexual arousal*

In order to translate blood flow data generated using this model to those observed in a human model of sexual arousal, we directly compared our data with vaginal blood flow and cardiovascular data generated in pre-clinical studies.

We found that VIP infusion has the following effects in rabbit model of sexual arousal:-

- Exogenous VIP (*iv* infusion) induces significant concentration-dependent increases in vaginal blood flow (See Figure 2a). These increases are significantly elevated above basal blood flow values when recorded either on the intra- or extravaginal wall. Vaginal blood flow was significantly increased by 24.7±3.6ml/min/100g tissue with an intravenous administration of VIP (3μg/kg). The blood flow remained elevated above basal for about 11 minutes post-infusion. Lower doses induced smaller increases eg 0.3μg/kg, elevated blood flow by 7.5±1.3ml/min/100g tissue and blood flow was elevated for 7 minutes post-infusion.

- Repetitive infusions of similar doses of VIP (*iv* at 30 minute intervals) induce significant reproducible increases in vaginal blood flow (See Figure 2b).

- VIP (*iv*) significantly increases heart rate and decreases mean arterial blood pressure (See Figure 3). At 0.3μg/kg VIP (*iv*) caused significant reduction in mean arterial blood pressure of 13.2±0.7mm Hg and a significant increase in heart rate of 16±4 beats per minute.

This animal model directly reflects the clinical data observed upon infusion of VIP into health volunteers ie increased vaginal blood flow, suppressed blood pressure and elevated heart rate. Therefore this model can be used to investigate the mechanism(s) that underlie physiological changes that occur during sexual arousal and additionally to validate novel approaches for the enhancement of vaginal blood flow and hence treatment of FSAD.

### 4.3 *VIP-induces changes in vaginal blood flow via stimulation of the cAMP/adenylate cyclase pathway*

Ottesen and co-workers demonstrated that VIP induces increases in vaginal blood flow and lubrication in healthy volunteers. However the mechanism by which VIP exert it's effects are unclear. In the literature, there are plenty of examples of VIP signalling through different second messenger systems including cGMP/guanylate cyclase (Ashur-Fabian, 1999), carbon monoxide/heme oxygenase (Fan, 1998) and cAMP/adenylate cyclase (Schoeffter, 1985; Gu, 1992; Foda, 1995). This is exemplified by a recent report which describes how the relaxant effects of VIP in the uterine artery can be explained by the release of nitric oxide (Jovanovic, 1998). Interestingly there is also evidence for VIP modulating NO/cGMP in male urogenital function (Kim, 1994) and there is direct evidence that treatment of human vaginal smooth muscles cell cultures, with VIP (0.5μM) fails to elevate cAMP levels (Traish, 1999 *ibid*).

In this study we have shown that VIP induces vasorelaxation via elevation of intracellular cAMP levels. By conducting a series of functional experiments we have measured blood flow and smooth muscle relaxation in addition to biochemically measuring intracellular cAMP concentrations. We have used forskolin, an activator of adenylate cyclase or cAMPmimetic, to mimic the effects of activating the cAMP/adenylate cyclase pathway. VIP and forskolin have identical effects on the physiological arousal effects on vaginal blood flow and relaxation.

VIP (1µg/kg) and forskolin (40nmol/kg) induces significant increases in vaginal blood flow 13.2 and 12.7ml/min/100mg tissue respectively (See figures 2a and 4a). These changes in amplitude induced by VIP and forskolin were not significantly different. These increases are significantly elevated above basal blood flow values when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall.

VIP (0.1µM) and forskolin (10µM) both significantly increased intracellular concentrations cAMP above basal levels in isolated vaginal tissue (See Figure 4b).

VIP (0.1µM) and forskolin (10µM) elevate basal concentrations from 276nM by 156% and 238% respectively. The differences in these percentages reflects the difference in concentrations of VIP and forskolin used eg VIP at a concentration of 0.1µM relaxes precontracted isolated vagina by circa 80% where as 10µM forskolin is sufficient to completely relax isolated tissue.

Additionally we showed that VIP and forskolin induces relaxation in isolated vaginal tissue with $EC_{50}$ values of 18.8±0.6nM and 320±20nM respectively (See Figure 4c).

These data establish that VIP induces vaginal vasorelaxation via the cAMP/adenylate cyclase pathway, hence this model can be used to investigate whether pelvic nerve stimulation, i.e. sexual arousal, leads to the release of VIP/activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway. In addition, approaches to enhance vaginal blood flow during sexual arousal, eg by directly or indirectly enhancing cAMP signalling, can also be investigated.

### 4.4 *cAMP is the mediator of vaginal vasorelaxation*

The neurotransmitter and second messenger candidates responsible for increases in vaginal blood flow during sexual arousal are currently unidentified. Todate, workers have focused on the nitric oxide (NO)/cGMP pathway. In accordance with the present invention, we have demonstrated that:- 1.) the cAMP/adenylate cyclase pathway mediates VIP-induced increases in vaginal blood flow; 2.) VIP is the endogenous neurotransmitter released during sexual arousal and 3.) endogenously released VIP induces it's vasorelaxant effects via elevation of cAMP.

The neurotransmitter responsible for vaginal wall relaxation is currently unidentified. We have shown that VIP is the neurotransmitter release upon stimulation of the pelvic nerve and that cAMP mediates the VIP-mediated vasorelaxation. Agents that prevent the metabolism of VIP or directly enhance cAMP signalling enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow eg NEP inhibitors or $PDE_{cAMP}$ inhibitors respectively (see following sections).

In our studies, we have found that we believe that we can exclude a role for NO in arousal-induced increases in vaginal blood flow. In this respect, we have shown that a potent and selective PDE type 5 inhibitor has no effect on either pelvic nerve stimulated- or VIP-induced increases in vaginal blood flow (-5.3±5.5% change in blood flow at 60μg/kg). Additionally a PDE type 5 inhibitor has a minimal effect on VIP- or electrical field stimulated (EFS)- induced-relaxations of isolated vaginal smooth muscle (30% enhancement of VIP-induced relaxations; See table 1).

Table 1:- Enhancement of VIP mediated relaxation of isolated rabbit vagina. This table illustrated the percentage enhancement of the $EC_{50}$ for VIP-induced relaxations of precontracted vaginal smooth muscle (1μM phenylephrine). Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ types 1, 2, 3 and 4 all significantly potentiated VIP-mediated relaxations whereas a selective inhibitor of $PDE_{cGMP}$ type 5 or vehicle control had no effect on VIP-mediated relaxations.

| PDE inhibitor at selective dose | Percentage enhancement of VIP-induced relaxation |
|---|---|
| $PDE_{cAMP}$ type 1 | 210% |
| $PDE_{cAMP}$ type 2 | 130% |
| $PDE_{cAMP}$ type 3 | 220% |
| $PDE_{cAMP}$ type 4 | 160% |
| $PDE_{cGMP}$ type 5 | No effect (30%) |
| Control - vehicle | No effect |

We have shown that VIP is also the endogenous NANC (non-adrenergic, non-cholinergic) neurotransmitter partially responsible for EFS-induced relaxations of isolated vaginal smooth muscle. A high dose of a nitric oxide synthase inhibitor (L-NOARG, 300μM) only inhibits 50% of EFS-induced relaxations. A NEP inhibitor (1μM), which will prevent NEP-induced metabolism of VIP and hence enhance VIP signalling, enhances the non-nitric oxide NANC relaxation induced by EFS. We have shown that both NO and VIP regulate smooth muscle tone in the vaginal wall. Therapeutically it will be possible to enhance relaxations of vaginal smooth muscle with agents that enhance NO/cGMP and/or VIP/cAMP mediated signalling.

### *4.5 Vaginal blood flow is enhanced by pharmacological agents that directly or indirectly elevate cAMP levels*

FSAD is associated with and may result from reduced vaginal blood flow. Potential approaches to treat this disorder revolve around enhancing genital blood flow. Having established that cAMP is the mediator of vaginal vasorelaxation and that elevations of cAMP result from neuronally released VIP, we believe that if cAMP signalling is enhanced, then as a consequence vaginal blood flow will be increased, hence restoring vaginal blood flow to normal levels and treating FSAD. We have initially chosen 3 targets to directly or indirectly enhance cAMP-mediated vasorelaxation - $PDE_{cAMP}$ inhibitors, eg $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitors, NEP (EC 3.4.24.11) inhibitors and neuropeptide Y Y1 (NPY Y1) receptor antagonists.

### 4.5.1 Neutral Endopeptidase (NEP EC 3.4.24.11) inhibitors

NEP EC3.4.24.11 metabolises VIP and hence terminates VIP-mediated biological activity. NEP inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of VIP released during arousal. This will have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

There have been no previous literature reports of NEP EC3.4.24.11 localisation or of it's functional role in vaginal tissue or a role in sexual arousal.

Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 at clinically relevant doses significantly enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow (See Figure 5).

A NEP inhibitor enhanced the peak increase in vaginal blood flow by up to 53% compared to time matched control increases. This enhancement of submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz), was dose dependant eg 0.1mg/kg iv induced a 35.0±7.6% increase; 0.3mg/kg iv induced a 42.6.0±27.7% increase and 1.0mg/kg iv induced a 52.8±32.5% increase. NEP inhibitors had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow. Hence, the agents of the present invention enhance arousal, by potentiating cAMP signalling, rather than induce arousal in the absence of sexual desire ie by direct increasing cAMP signalling.

Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11, at clinically relevant doses, enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow when compared to time-matched controls. At submaximal doses of VIP (eg. 0.3μg/kg) a significant potentiation in both the peak increase (95±6%) and prolongation of the duration of the enhancement (*circa* 140% - from 7 to in excess of 17 minutes; See Figure 6). NEP inhibitors significantly prolong the duration of VIP-induced elevation of vaginal blood flow when given in combination with dose of VIP that produce maximal flow increases (*circa* 80% increase in duration - 11 to 20 minutes).

NEP inhibitors at clinically relevant doses significantly enhance VIP-induced and nerve-mediated relaxations in isolated tissue. The $EC_{50}$ for VIP is significantly reduced from 18.8±0.6nM to 2.9±0.3nM in the presence of a selective NEP inhibitor (1μM). The effect of the NEP inhibitor is concentration dependent.

NEP EC 3.4.24.11 mRNA message and protein is expressed and has been identified in human and rabbit vagina by Northern and Western analyses.

### 4.5.2 Phosphodiesterase (PDE) inhibitors

cAMP is degraded by cAMP-hydrolysing PDEs ie. $PDE_{cAMP}$. $PDE_{cAMP}$ inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of cAMP released during arousal. This should have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

There are no literature reports of $PDE_{cAMP}$ localisation or of a functional role of these isozymes in vaginal tissue or a role in sexual arousal. We have shown by PDE profiling of human and rabbit vagina that the following $PDE_{cAMP}$ 1, 2, 3, 4, 7 & 8 isozymes are present. Inhibitors of these $PDE_{cAMP}$ represent potential agents to enhance vaginal blood flow and/or relax vaginal smooth muscle.

A selective inhibitor of $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor at clinically relevant doses significantly enhances pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow (See Figure 7). A $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor (500µg/kg; iv) enhanced the peak increase in vaginal blood flow by 86.8±21.9% compared to increases observed during time matched control (@4Hz).

A selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor significantly enhanced the duration of VIP-induced increases in peak vaginal blood flow by over 100% (measured at 50% amplitude; See Figure 8). The selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor significantly enhances the peak increase in blood flow induced by pelvic nerve stimulation (circa 15±3% [200µg/kg] at 4Hz).

$PDE_{cAMP}$ inhibitors enhance VIP-induced relaxations of precontracted isolated vaginal smooth muscle (1µM phenylephrine; See Table 1). Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ types 1, 2, 3 and 4 all significantly potentiated VIP-mediated relaxations. (210% @ 76nM, 130% @ 8nM, 220% @ 3.4µM and 160% @ 686nM potentiation of VIP $EC_{50}$ values) These inhibitors were administered at dose known to be selective for the particular $PDE_{cAMP}$ of interest. A selective inhibitor of $PDE_{cGMP}$ type 5 or vehicle control had no viable effect on VIP-mediated relaxations.

1091

### 4.5.3 NPY Y1 receptor antagonists

NPY exerts an inhibitory influence over VIP-mediated vasorelaxation and NPY Y1 receptor antagonists will facilitate the vasorelaxant effect of endogenous VIP released during arousal. This will have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

There are no literature reports of NPY receptor localisation or of a functional role for these receptors in vaginal tissue or a role in sexual arousal.

NPY receptor expression studies have identified by Northern and Western analyses that NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes are present in human and rabbit vagina.

Selective inhibitors of NPY Y1 at clinically relevant doses significantly enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow (See Figure 9). An NPY Y1 anatgonist enhanced the peak increase in vaginal blood flow by up to 92% compared to time matched control increases. This enhancement of submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz), was dose dependant eg 0.01mg/kg iv induced a 15.8±19.6% increase; 0.03mg/kg iv induced a 35.1±17.17% increase; 0.10mg/kg iv induced a 60.1±16.9% increase and 0.3mg/kg iv induced a 91.9±27.4% increase (mean±sem n=3). NPY Y1 antagonists had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow. This reinforces our view that they will enhance arousal, by potentiating cAMP signalling, rather than induce arousal in the absence of sexual desire ie by direct increasing cAMP signalling.

### *4.6 Effects of agents that enhance cAMP or increase vaginal blood flow on the mean arterial blood pressure in the anaesthetised rabbit*

In the search for an oral therapy for FSAD it is desirable that that there are no associated adverse cardiovascular effects eg effect on blood pressure or heart rate. In our studies, we have found that infusions of VIP significantly reduce mean arterial blood pressure (See Figure 3) and significantly increased heart rate. Hence, in a highly preferred aspect, the agent is not VIP. Pelvic nerve stimulation and inhibitors of $PDE_{cAMP}$ and NEP however had no effect on blood pressure. At 0.3µg/kg VIP (*iv*), caused a significant reduction in mean arterial blood pressure of 13.2±0.7mm Hg and a significant increase in heart rate of 16±4 beats per minute. At higher doses such as 3.0μg/kg VIP (*iv*) caused significant reduction in mean arterial blood pressure of 14.7±1.37mm Hg and this was associated with a significant increase in heart rate of 111±30 beats per minute which then increased mean arterial blood pressure by 8.5±1.4mm Hg.

## COMPOUNDS TESTED

A series of compounds mentioned above were tested in accordance with the present invention and were found to be effective in accordance with the present invention – i.e. they can act as $P_{cAMP}$ in order to treat FSD, in particular FSAD.

These compounds included:

Compound of Formula Ia ("FIa") – *viz* 5-[4-(diethylamino)benzyl]-1-methyl-3-propyl-6,7-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one. FI may be prepared according to the teachings of EP-A-0911333 (Example 50 thereof).

Compound of Formula II ("FII") – *viz* 9-(1-acetyl-4-phenylbutyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-one. FII may be prepared according to the teachings of EP-A-0771799 (Example 100 thereof).

Compound of Formula III ("FIII") – *viz* Milrinone. FIII is a commercially available product.

Compound of Formula IV ("FIV") – *viz* Rolipram. FIV is a commercially available product.

Compound of Formula V ("FV") – *viz* cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[[1-(2-carboxy-4-pentenyl)cyclopentyl]carbonyl]amino]-,1-ethyl ester. FV may be prepared according to the teachings of EP-A-0274234 (Example 300 thereof).

Compound of Formula VI ("FVI") – *viz* cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[[1-(2-carboxy-4-pentenyl)cyclopentyl]carbonyl]amino]-. FVI may be prepared according to the teachings of EP-A-0274234 (Example 379 thereof).

In particular, FI, FII, FIII and FIV are $PDE_{cAMP}$ inhibitors. FI is a I:PDEI, FII is a I:PDEII, FIII is a I:PDEIII and FIV is a I:PDEIV.

The data for these compounds are presented above in the previous Example sections – for example see Table I.

As is evident, these $PDE_{cAMP}$ inhibitors enhance VIP-induced relaxations of isolated tissue.

FII – which is a selective I:PDEII - enhances VIP-induced increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FII also enhances pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI are selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11.

The data presented above in the previous Example sections are for FVI. However, similar results were obtained for FV.

As is evident, FV and FVI enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI also enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI also enhance VIP-induced and nerve-mediated relaxations of isolated tissue at clinically relevant doses.

## CONCLUSIONS

We have developed an animal model that mimics the physiological arousal response observed during female sexual arousal and directly reflects the clinical data obtained in human volunteers. The model uses Laser Doppler technologies to record small changes in vaginal blood flow induced by pelvic nerve stimulation or vasoactive neurotransmitters. During sexual arousal, there is an increase in vaginal blood flow resulting from increased innervation from the pelvic nerve. The pelvic nerve-stimulated increase in vaginal blood flow, observed in the animal model, represents the endogenous vascular effects observed during female sexual arousal. Therefore this model can be used to firstly, identify the mechanisms involved in the regulation of vaginal blood flow and secondly, use the model to validate novel approaches for the enhancement of vaginal blood flow.

This study has successfully used a combination of *in vivo*, *in vitro* and biochemical techniques to identify cAMP as the mediator/second messenger regulating vaginal vasorelaxation (and vaginal wall relaxation). Using this animal model we have demonstrated that VIP is released during pelvic nerve stimulation and that inhibitors of the enzyme responsible for VIP metabolism, NEP, are capable of enhancing nerve stimulated increases in vaginal blood flow. We have shown that VIP-mediated increases in vaginal blood flow result from elevation of tissue cAMP, whereas previously VIP had been shown to increase vaginal blood flow in healthy volunteers but the cellular mechanism was not identified. Additionally, we have demonstrated that vaginal blood flow can be enhanced directly with a cAMPmimetic or indirectly by elevating cAMP concentrations with a $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor or an NPY Y1 antagonist.

The major cause of FSAD is decreased genital blood flow and this manifests itself as reduced vaginal, labial and clitoral engorgement. Treatment of women with FSAD is achievable by restoration of the *normal* sexual arousal response. This can be achieved by enhancing genital blood flow. Our approach for the treatment of FSAD will be to enhance the natural sexual arousal response - and optionally vaginal blood flow/lubrication - by either directly or indirectly potentiating endogenous cAMP signalling eg with an inhibitor of NEP (EC 3.4.24.11) or a cAMP-hydrolysing PDE inhibitor or a NPY receptor antagonist. This will have the overall effect of restoring or mimicking the *normal* arousal response with no cardiovascular side effects. Sexual arousal/engorgement will be enhanced, rather than simply being induced in the absence of sexual drive, which may be the case with some exogenously administered vasoactive agents eg VIP.

All publications mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described methods and system of the present invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the present invention. Although the present invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in biochemistry and biotechnology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

## GENERAL TEXT REFERENCES

Ashur-Fabian, O., Perl ,O., Lilling, G., *et al.* (1999). SNV, a lipophilic superactive VIP analog, acts through cGMP to promote neuronal survival. *Peptides*, **20**, 629-633.

Berman, J.R., Berman, L. & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: incidence, pathophysiology, evaluation, and treatment options. *Urology*, **54**, 385-391.

Berman, J., Goldstein, I., Werbin, T. *et al.* (1999a). Double blind placebo controlled study with crossover to assess effect of sildenafil on physiological parameters of the female sexual response. *J. Urol.*, **161**, 805.

*Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV*, American Psychiatric Association: Washington, DC., 1987, pp 493-518.

Fan, Y.P., Chakder, S. & Ratton, S. (1998). Inhibitory effect of zinc protoporphyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal polypeptide and other receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 468-474.

Foda, H.D., Sharaf, H.H., Absood, A. *et al.* (1995). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides*, **16**, 1057-1061.

Frank, E., Anderson, C. & Rubinstein, D. (1978). Frequency of sexual dysfunction in "normal" couples. *N. Engl. J. Med.*, **229**, 111-115.

Goldstein, I. & Berman, J.R. (1998). Vasculogenic female sexual dysfunction: vaginal engorgement and clitoral erectile insufficiency syndromes. *Int. J. Impot. Res.*, **10**, S84-S90.

Gu, Z.F., Jensen, R.T. & Maton, P.N. (1992). A primary role for protein kinase A in smooth muscle relaxation induced by adrenergic agonists and neuropeptides. *Am. J. Physiol.*, **263**, G360-G364.

1094

Hoyle, C.H.V., Stones, R.W., Robson, T. *et al.* (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide containing nerves. *J. Anat.*, **188**, 633-644.

Ingenhoven, N. & Beck-Sickinger, A.G. (1997). Flourescent labelled analogues of neuropeptide Y for the characterisation of cells expressing NPY receptor subtypes. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **17**, 407-418.

Jovanovic, A., Jovanovic, S., Tulic,. I. *et al.* (1998). Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Human Reprod.*, **4**, 71-76.

Kaplan, H.S. (1974). The New Sex Therapy. London, Bailliere Tindall.

Kaplan, S.A., Reis, R.B., Kohm, I.J. *et al.* (1999). Safety and efficacy of sildenafil in postmenopausal women with sexual dysfunction. *Urology*, **53**, 481-486.

Kim, Y.C., Choi, H.K., Ahn, Y.S., *et al.* (1994). The effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on rabbit cavernosal smooth muscle contractility. *J. Androl.*, **15**, 392-739.

Laan, E. & Everaerd, W. (1998). Physiological measures of vaginal vasocongestion. *Int. J. Impot. Res.*, **10**, S107-S110.

Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, **10**, S104-S106.

Levin, R.J. (1980). The physiology of sexual function in women. *Clin. Obstet. Gynecol.*, **7**, 213-252.

Levin, R.J. (1991). VIP, vagina, clitoral and preurethral glans: An update on female genital arousal. *Exp. Clin. Endocrinol.*, **98**, 61-69.

Levin, R.J. (1992). The mechanisms of human female sexual arousal. *Ann. Rev. Sex Res.*, **3**, 1-48.

Levin, R.J. & Wagner, G. (1986). TRH and vaginal blood flow-effects in concious women and anaesthetised sheep. *J. Physiol.*, **373**, 83P.

Lundberg, J.M., Modin, A. & Malmstrom, R.E. (1996). Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **17**, 301-304.

Masters, W.H., Johnson, V.E. *Human Sexual Response*. Little, Brown: Boston, 1996.

Ottesen, B., Gerstenberg, T., Ulrichsen, H. *et al.* (1983). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases vaginal blood flow and inhibits smooth muscle activity in women. *Eur. J. Clin. Invest.*, **13**, 321-324.

Ottesen, B., Wagner, G. & Fahrenkrug, J. *Peptide innervation of the sexual organs.* In: Handbook of Sexology, Vol. 6, The Pharmacological and Endocrinology of Sexual Function, Sitsen, J.M.A. (eds), Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1988), chapter 4, pp 66-97.

Ottensen, B., Pedersen, B., Nielsen, J. *et al.* (1987). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides*, **8**, 797-800.

Park, K., Goldstein, I., Andry, C., *et al.* (1997). Vasculogenic female sexual dysfunction: The hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. *Int. J. Impotence Res.*, **9**, 27-37.

Rosen, R., Taylor, J., Leiblum, S. *et al.* (1993). Prevalence of sexual dysfunction in women: results of a survey of 329 women in an outpatient gynecological clinic. *J. Sex Marital Ther.*, **19**, 171-188.

Schiavi, R.C. & Seagraves, R.T. (1995). The biology of sexual function. *Psychiat. Clin. North. Am.*, **18**, 7-23.

Schoeffter, P. & Stoclet, J.C. (1985). Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, **109**, 275-279.

1095 1096

Serradeil-Le Gal, C., Valette, G., Rouby, P.E. *et al.* (1995). SR 120819A, an orally-active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Letters*, 3, 192-196.

Sjoberg, I. (1992). The vagina: Morphological, functional and ecological aspects. *Acta Obst. Gynecol. Scand.*, 71, 84-85.

Spector, I.P. & Carey, M.P. (1990). Incidence and prevalence of sexual dysfunctions: a critical review of the empirical literature. *Arch. Sex. Behav.*, 19, 389-408.

Wagner, G. (1992). Aspects of genital physiology and pathology. *Sem. Neurol.*, 12, 87-97.

Werbin, T., Salimpour, P., Berman, L., et al. (1999). Effect of sexual stimulation and age on genital blood flow in women with sexual stimulation. *J. Urol.*, 161, 688

Wincze, J.P., Albert, A. & Bansal, S. (1993). Sexual arousal in diabetic females: Physiological and self-report measures. *Arch. Sex Behav.*, 22, 587-601.

Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M. *et al.* (1995). Subtype selectivity and antagonist profile of the nonpeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J Pharmacol Exp Ther.*, 275, 143-9.

## REFERENCES FOR THE PDE SECTION

Han, P.; Fletcher, C. F.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Yaremko, L. M.; Michaeli, T. : Assignment of the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3 and of the human PDE7A gene to chromosome 8q13. Genomics 48: 275-276, 1998.

2. Michaeli, T.; Bloom, T. J.; Martins, T.; Loughney, K.; Ferguson, K.; Riggs, M.; Rodgers, L.; Beavo, J. A.; Wigler, M. : Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 268: 12925-12932, 1993.

3. Milatovich, A.; Bolger, G.; Michaeli, T.; Francke, U. : Chromosome localizations of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse. Somat. Cell Molec. Genet. 20: 75-86, 1994.

4. Rosman, G. J.; Martins, T. J.; Sonnenburg, W. K.; Beavo, J. A.; Ferguson, K.; Loughney, K. : Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3-prime,5-prime-cyclic nucleotide phosphodiesterase. Gene 191: 89-95, 1997.

1096.

## REFERENCES FOR THE NEP SECTION

1. Barker, P. E.; Shipp, M. A.; D'Adamio, L.; Masteller, E. L.; Reinherz, E. L. The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3(q21-q27). J. Immun. 142: 283-287, 1989.

2. D'Adamio, L.; Shipp, M. A.; Masteller, E. L.; Reinherz, E. L. : Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5-prime untranslated regions. Proc. Nat. Acad. Sci. 86: 7103-7107, 1989.

3. Letarte, M.; Vera, S.; Tran, R.; Addis, J. B. L.; Onizuka, R. J.; Quackenbush, E. J.; Jongeneel, C. V.; McInnes, R. R. : Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. J. Exp. Med. 168: 1247-1253, 1988.

4. Shipp, M. A.; Vijayaraghavan, J.; Schmidt, E. V.; Masteller, E. L.; D'Adamio, L.; Hersh, L. B.; Reinherz, E. L. : Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ('enkephalinase'): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. 86: 297-301, 1989.

5. Tran-Paterson, R.; Willard, H. F.; Letarte, M. : The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase--3.4.24.11) gene is located on human chromosome 3. Cancer Genet. Cytogenet. 42: 129-134, 1989.

## REFERENCES FOR THE NPY SECTION

1. Allen, J. M.; Bloom, S. R. : Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8: 1-8, 1986.

2. Bahary, N.; Zorich, G.; Pachter, J. E.; Leibel, R. L.; Friedman, J. M. : Molecular genetic linkage maps of mouse chromosomes 4 and 6. Genomics 11: 33-47, 1991.

3. Baker, E.; Hort, Y. J.; Ball, H.; Sutherland, G. R.; Shine, J.; Herzog, H. : Assignment of the human neuropeptide Y gene to chromosome 7p15.1 by nonisotopic in situ hybridization. Genomics 26: 163-164, 1995.

5. Carr, L. G.; Foroud, T.; Bice, P.; Gobbett, T.; Ivashina, J.; Edenberg, H.; Lumeng, L.; Li, T. K. : A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. Alcohol Clin. Exp. Res. 22: 884-887, 1998.

5. Dockray, G. J. : Neuropeptide Y: in search of a function. Neurochem. Int. 8: 9-11, 1986.

6. Erickson, J. C.; Clegg, K. E.; Palmiter, R. D. : Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. Nature 381: 415-421, 1996. PubMed ID : 8632796

7. Erickson, J. C.; Hollopeter, G.; Palmiter, R. D. : Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274: 1704-1706, 1996.

8. Karvonen, M. K.; Pesonen, U.; Koulu, M.; Niskanen, L.; Laakso, M.; Rissanen, A.; Dekker, J. M.; 't Hart, L. M.; Valve, R.; Uusitupa, M. I. : Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. Nature Med. 4: 1434-1437, 1998.

9. Maccarrone, C.; Jarrott, B. : Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8: 13-22, 1986.

10. Meisler, M. H.; Spence, J. E.; Dixon, J. E.; Caldwell, R. M.; Minth, C. D.; Beaudet, A. L. : Exclusion of close linkage between the loci for cystic fibrosis and neuropeptide Y on human chromosome 7. Cytogenet. Cell Genet. 44: 175-176, 1987.

11. Minth, C. D.; Andrews, P. C.; Dixon, J. E. : Characterization, sequence, and expression of the cloned human neuropeptide Y gene. J. Biol. Chem. 261: 11974-11979, 1986.

12. Minth, C. D.; Bloom, S. R.; Polak, J. M.; Dixon, J. E. : Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 4577-4581, 1984.

13. Takeuchi, T.; Gumucio, D.; Eddy, R.; Meisler, M.; Minth, C.; Dixon, J.; Yamada, T.; Shows, T. : Assignment of the related pancreatic polypeptide (PPY) and neuropeptide Y (NPY) genes to regions on human chromosomes 17 and 7. (Abstract) Cytogenet. Cell Genet. 40: 759 only, 1985.

14. Takeuchi, T.; Gumucio, D. L.; Yamada, T.; Meisler, M. H.; Minth, C. D.; Dixon, J. E.; Eddy, R. E.; Shows, T. B. : Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. J. Clin. Invest. 77: 1038-1041, 1986.

15. Terenghi, G.; Polak, J. M.; Hamid, Q.; O'Brien, E.; Denny, P.; Legon, S.; Dixon, J.; Minth, C. D.; Palay, S. L.; Yasargil, G.; Chan-Palay, V. : Localization of neuropeptide Y mRNA in neurons of human cerebral cortex by means of in situ hybridization with a complementary RNA probe. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 7315-7318, 1987.

16. Thiele, T. E.; Marsh, D. J.; Ste. Marie, L.; Bernstein, I. L.; Palmiter, R. D. : Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. Nature 396: 366-369, 1998.

17. Uusitupa, M. I. J.; Karvonen, M. K.; Pesonen, U.; Koulu, M. : Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism. Ann. Med. 30: 508-510, 1998.

REFERENCES FOR THE NPYR1 SECTION

1. Herzog, H.; Baumgartner, M.; Vivero, C.; Selbie, L. A.; Auer, B.; Shine, J. : Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor. J. Biol. Chem. 268: 6703-6707, 1993.

2. Herzog, H.; Darby, K.; Ball, H.; Hort, Y.; Beck-Sickinger, A.; Shine, J. : Overlapping gene structure of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests coordinate transcriptional regulation. Genomics 41: 315-319, 1997.

3. Herzog, H.; Hort, Y. J.; Ball, H. J.; Hayes, G.; Shine, J.; Selbie, L. A. : Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. Proc. Nat. Acad. Sci. 89: 5794-5798, 1992.

4. Larhammar, D.; Blomqvist, A. G.; Yee, F.; Jazin, E.; Yoo, H.; Wahlestedt, C. : Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. J. Biol. Chem. 267: 10935-10938, 1992.

5. Lutz, C. M.; Frankel, W. N.; Richards, J. E.; Thompson, D. A. : Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

## REFERENCES FOR THE NPYR2 SECTION

1. Ammar, D. A.; Eadie, D. M.; Wong, D. J.; Ma, Y.-Y.; Kolakowski, L. F., Jr.; Yang-Feng, T. L.; Thompson, D. A. : Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide Y receptor gene. Genomics 38: 392-398, 1996.

2. Gerald, C.; Walker, M. W.; Vaysse, P. J.-J.; He, C.; Branchek, T. A.; Weinshank, R. L. : Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. J. Biol. Chem. 270: 26758-26761, 1995.

3. Lutz, C. M.; Frankel, W. N.; Richards, J. E.; Thompson, D. A. : Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

4. Rose, P. M.; Fernandes, P.; Lynch, J. S.; Frazier, S. T.; Fisher, S. M.; Kodukula, K.; Kienzle, B.; Seethala, R. : Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. J. Biol. Chem. 270: 22661-22664, 1995.

## REFERENCES FOR THE VIP SECTION

1. Bodner, M.; Fridkin, M.; Gozes, I. : Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3548-3551, 1985.

2. Gotoh, E.; Yamagami, T.; Yamamoto, H.; Okamoto, H. : Chromosomal assignment of human VIP/PHM-27 gene to 6q26-q27 region by spot blot hybridization and in situ hybridization. Biochem. Int. 17: 555-562, 1988.

3. Gozes, I.; Avidor, R.; Yahav, Y.; Katznelson, D.; Croce, C. M.; Huebner, K. : The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21-6qter. Hum. Genet. 75: 41-44, 1987.

4. Gozes, I.; Nakai, H.; Byers, M.; Avidor, R.; Weinstein, Y.; Shani, Y.; Shows, T. B. : Sequential expression in the nervous system of C-MYB and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24. Somat. Cell Molec. Genet. 13: 305-313, 1987.

5. Heinz-Erian, P.; Dey, R. D.; Flux, M.; Said, S. I. : Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. Science 229: 1407-1408, 1985.

6. Itoh, N.; Obata, K.; Yanaihara, N.; Okamoto, H. : Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature 304: 547-549, 1983.

7. Linder, S.; Barkhem, T.; Norberg, A.; Persson, H.; Schalling, M.; Hokfelt; T.; Magnusson, G. : Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 605-609, 1987.

8. Omary, M. B.; Kagnoff, M. F. : Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line. Science 238: 1578-1581, 1987.

## REFERENCES FOR THE AC SECTION

1. Parma, J.; Stengel, D.; Gannage, M.-H.; Poyard, M.; Barouki, R.; Hanoune, J. : Sequence of a human brain adenylyl cyclase partial cDNA: evidence for a consensus cyclase domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 455-462, 1991.

2. Stengel, D.; Parma, J.; Gannage, M.-H.; Roeckel, N.; Mattei, M.-G.; barouki, R.; Hanoune, J. : Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. Hum. Genet. 90: 126-130, 1992.

## REFERENCES FOR THE VPAC1 SECTION

1. Couvineau, A.; Rouyer-Fessard, C.; Darmoul, D.; Maoret, J.-J.; Carrero, I.; Ogier-Denis, E.; Laburthe, M. : Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains. Biochem. Biophys. Res. Commun. 200: 769-776, 1994.

2. Hashimoto, H.; Nishino, A.; Shintani, N.; Hagihara, N.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Yamamoto, K.; Matsuda, T.; Ishihara, T.; Nagata, S.; Baba, A. : Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VPAC-1) receptor. Genomics 58: 90-93, 1999.

3. Libert, F.; Passage, E.; Parmentier, M.; Simons, M.-J.; Vassart, G.; Mattei, M.-G. : Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonin receptor. Genomics 11: 225-227, 1991.

4. Sreedharan, S. P.; Huang, J.-X.; Cheung, M.-C.; Goetzl, E. J. : Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. Proc. Nat. Acad. Sci. 92: 2939-2943, 1995.

5. Sreedharan, S. P.; Patel, D. R.; Huang, J.-X.; Goetzl, E. J. : Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193: 546-553, 1993.

6. Sreedharan, S. P.; Robichon, A.; Peterson, K. E.; Goetzl, E. J. : Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. 88: 4986-4990, 1991.

7. Vassart, G. : Personal Communication. Brussels, Belgium, 1/15/1992. 8. Wenger, G. D. : Personal Communication. Columbus, Ohio, 8/3/1993.

1100

1101

## REFERENCES FOR THE VPAC2 SECTION

1. Adamou, J. E.; Aiyar, N.; Van Horn, S.; Elshourbagy, N. A. : Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commmun. 209: 385-392, 1995.

2. Mackay, M.; Fantes, J.; Scherer, S.; Boyle, S.; West, K.; Tsui, L.-C.; Belloni, E.; Lutz, E.; Van Heyningen, V.; Harmar, A. J. : Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. Genomics 37: 345-353, 1996.

3. Svoboda, M.; Tastenoy, M.; Van Rampelbergh, J.; Goossens, J.-F.; De Neef, P.; Waelbroeck, M.; Robberecht, P. : Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochem. Biophy. Res. Commun. 205: 1617-1624, 1994.

## SEQUENCE LISTINGS

## 1. NEP (EC 3.4.24.11)

```
LOCUS       HSMRNAEN     3181 bp    mRNA            PRI       12-SEP-1993
DEFINITION  Human mRNA for enkephalinase (EC 3.4.24.11).
ACCESSION   X07166
NID         g34757
VERSION     X07166.1  GI:34757
KEYWORDS    enkephalinase; metalloprotein; neutral endopeptidase.
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
            Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 3181)
  AUTHORS   Malfroy,B., Kuang,W.J., Seeburg,P.H., Mason,A.J. and Schofield,P.R.
  TITLE     Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase
            (neutral endopeptidase)
  JOURNAL   FEBS Lett. 229 (1), 206-210 (1988)
  MEDLINE   88152222
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..3181
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /tissue_type="placenta"
                     /clone_lib="lambda gt10"
                     /clone="lambda H7"
     CDS             18..2249
                     /note="enkephalinase (AA 1-743)"
                     /codon_start=1
                     /protein_id="CAA30157.1"
                     /db_xref="PID:g34758"
                     /db_xref="GI:34758"
                     /db_xref="SWISS-PROT:P08473"
                     /translation="MDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYAT
                     YDDGICKSSDCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKYACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDI
                     LRDELEVVLKDVLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINESAIDSRGGEPLLKLLPDIYGW
                     PVATENWEQKYGASWTAEKAIAQLNSKYGKKVLINLFVGTDDKNSVNHVIHIDQPRLG
                     LPSRDYYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDENQLALEMNKVMELEKEI
                     ANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSLEINGKPFSWLNFTNEIMSTVNISITNE
                     EDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTYKESRNAFRKALY
                     GTTSETATWRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDD
                     LTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNKLNNEYLELNYKEDEYFENIIQNL
                     KFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSL
                     NYGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSASNFKEQSQCMVYQYGNFSW
                     DLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLGQAYRAYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQLFFLN
                     FAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEKKC
                     RVW"
     misc_feature    3073..3078
                     /note="poly A signal"
```

```
BASE COUNT     1055 a    582 c    657 g    887 t
ORIGIN
        1 gcaagtcaga aagtcagatg gatataactg atatcaacac tccaaagcca aagaagaaac
       61 agcgatggac tccactggag atcagcctct cggtccttgt cctgctcctc accatcatag
      121 ctgtgacaat gatcgcactc tatgcaacct acgatgatgg tatttgcaag tcatcagact
      181 gcataaaatc agctgctcga ctgatccaaa acatggatgc caccactgag ccttgtacag
      241 actttttcaa atatgcttgc ggaggctggt tgaaacgtaa tgtcattccc gagaccagct
      301 cccgttacgg caactttgac attttaagag atgaactaga agtcgttttg aaagatgtcc
      361 ttcaagaacc caaaactgaa gatatagtag cagtgcagaa agcaaaagca ttgtacaggt
      421 cttgtataaa tgaatctgct attgatagca gaggtggaga acctctactc aaactgttac
      481 cagacatata tgggtggcca gtagcaacag aaaactggga gcaaaaatat ggtgcttctt
      541 ggacagctga aaaagctatt gcacaactga attctaaata tgggaaaaaa gtccttatta
      601 atttgtttgt tggcactgat gataagaatt ctgtgaatca tgtaattcat attgaccaac
      661 ctcgacttgg cctccccttct agagattact atgaatgcac tggaatctat aaagaggctt
      721 gtacagcata tgtggatttt atgatttctg tggccagatt gattcgtcag gaagaaagat
      781 tgcccatcga tgaaaaccag cttgctttgg aaatgaataa agttatggaa ttggaaaaag
      841 aaattgccaa tgctacggct aaacctgaag atcgaaatga tccaatgctt ctgtataaca
      901 agatgacatt ggcccagatc caaaataact tttcactaga gatcaatggg aagccattca
      961 gctggttgaa tttcacaaat gaaatcatgt caactgtgaa tattagtatt acaaatgagg
     1021 aagatgtggt tgtttatgct ccagaatatt taaccaaact taagcccatt cttaccaaat
     1081 attctgccag agatcttcaa aatttaatgt cctggagatt cataatggat cttgtaagca
     1141 gcctcagccg aacctacaag gagtccagaa atgctttccg caaggccctt tatggtacaa
     1201 cctcagaaac agcaacttgg agacgttgtg caaactatgt caatgggaat atggaaaatg
     1261 ctgtggggag gctttatgtg gaagcagcat ttgctggaga gagtaaacat gtggtcgagg
     1321 atttgattgc acagatccga gaagttttta ttcagacttt agatgacctc acttggatgg
     1381 atgccgagac aaaaaagaga gctgaagaaa aggccttagc aattaaagaa aggatcggct
     1441 atcctgatga cattgtttca aatgataaca aactgaataa tgagtacctc gagttgaact
     1501 acaaagaaga tgaatacttc gagaacataa ttcaaaattt gaaattcagc caaagtaaac
     1561 aactgaagaa gctccgagaa aaggtggaca aagatgagtg gataagtgga gcagctgtag
     1621 tcaatgcatt ttactcttca ggaagaaatc agatagtctt cccagccggc attctgcagc
     1681 ccccttctt tagtgcccag cagtccaact cattgaacta tgggggcatc ggcatggtca
     1741 taggacacga aatcacccat ggcttcgatg acaatggcag aaactttaac aaagatggag
     1801 acctcgttga ctggtggact caacagtctg caagtaactt taaggagcaa tcccagtgca
     1861 tggtgtatca gtatggaaac ttttcctggg acctggcagg tggacagcac cttaatggaa
     1921 ttaatacact gggagaaaac attgctgata atggaggtct tggtcaagca tacagagcct
     1981 atcagaatta tattaaaaag aatggcgaag aaaaattact tcctggactt gacctaaatc
     2041 acaaacaact atttttcttg aactttgcac aggtgtggtg tggaacctat aggccagagt
     2101 atgcggttaa ctccattaaa acagatgtgc acagtccagg caatttcagg attattggga
     2161 ctttgcagaa ctctgcagag ttttcagaag cctttcactg ccgcaagaat tcatacatga
     2221 atccagaaaa gaagtgccgg gtttggtgat cttcaaaaga agcattgcag cccttggcta
     2281 gacttgccaa caccacagaa atggggaatt ctctaatcga aagaaaatgg gccctagggg
     2341 tcactgtact gacttgaggg tgattaacag agagggcacc atcacaatac agataacatt
     2401 aggttgtcct agaaagggtg tggagggagg aagggggtct aaggtctatc aagtcaatca
     2461 tttctcactg tgtacataat gcttaatttc taaagataat attactgttt atttctgttt
     2521 ctcatatggt ctaccagttt gctgatgtcc ctagaaaaca atgcaaaacc tttgaggtag
     2581 accaggattt ctaatcaaaa gggaaaagaa gatgttgaag aatacagtta ggcaccagaa
     2641 gaacagtagg tgacactata gtttaaaaca cattgcctaa ctactagttt ttacttttat
     2701 ttgcaacatt tacagtcctt caaaatcctt ccaaagaatt cttatacaca ttggggcctt
     2761 ggagcttaca tagttttaaa ctcatttttg ccatacatca gttattcatt ctgtgatcat
     2821 ttattttaag cactcttaaa gcaaaaaatg aatgtctaaa attgtttttt gttgtacctg
     2881 ctttgactga tgctgagatt cttcaggctt cctgcaattt tctaagcaat ttcttgctct
```

```
2941 atctctcaaa acttggtatt tttcagagat ttatataaat gtaaaaataa taatttttat
3001 atttaattat taactacatt tatgagtaac tattattata ggtaatcaat gaatattgaa
3061 gtttcagctt aaaataaaca gttgtgaacc aagatctata aagcgatata cagatgaaaa
3121 tttgagacta tttaaactta taaatcatat tgatgaaaag atttaagcac aaactttagg
3181 g
```

1102

## 2. PDE type 1

```
LOCUS       HSPDE1A3A    2008 bp    mRNA            PRI       12-APR-1996
DEFINITION  Human 3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase (HSPDE1A3A) mRNA,
            complete cds.
ACCESSION   U40370
NID         g1151108
VERSION     U40370.1  GI:1151108
KEYWORDS    calmodulin-stimulated phosphodiesterase.
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2008)
  AUTHORS   Loughney,K., Martins,T.J., Harris,E.A., Sadhu,K., Hicks,J.B.,
            Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A. and Ferguson,K.
  TITLE     Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human
            calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide
            phosphodiesterases
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 271 (2), 796-806 (1996)
  MEDLINE   96132810
REFERENCE   2  (bases 1 to 2008)
  AUTHORS   Loughney,K., Martins,T.J., Harris,E.A.S., Sadhu,K., Hicks,J.B.,
            Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A. and Ferguson,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-NOV-1995) Kate Loughney, ICOS, 22021 20th Ave. S.E.,
            Bothell, WA 98021, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2008
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            85..1692
                     /gene="PDE1A"
     CDS             85..1692
                     /gene="PDE1A"
                     /note="PDE1A3; type I phosphodiesterase"
                     /codon_start=1
                     /product="3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase"
                     /protein_id="AAC50436.1"
                     /db_xref="PID:g1151109"
                     /db_xref="GI:1151109"
                     /translation="MGSSATEIEELENTTFKYLTGEQTEKMWQRLKGILRCLVKQLER
                     GDVNVVDLKKNIEYAASVLEAVYIDETRRLLDTEDELSDIQTDSVPSEVRDWLASTFT
                     RKMGMTKKKPEEKPKFRSIVHAVQAGIFVERMYRKTYHMVGLAYPAAVIVTLKDVDKW
                     SFDVFALNEASGEHSLKFMIYELFTRYDLINRFKIPVSCLITFAEALEVGYSKYKNPY
                     HNLIHAADVTQTVHYIMLHTGIMHWLTELEILAMVFAAAIHDYEHTGTTNNFHIQTRS
                     DVAILYNDRSVLENHHVSAAYRLMQEEEMNILINLSKDDWRDLRNLVIEMVLSTDMSG
                     HFQQIKNIRNSLQQPEGIDRAKTMSLILHAADISHPAKSWKLHYRWTMALMEEFFLQG
                     DKEAELGLPFSPLCDRKSTMVAQSQIGFIDFIVEPTFSLLTDSTEKIVIPLIEEASKA
                     ETSSYVASSSTTIVGLHIADALRRSNTKGSMSDGSYSPDYSLAAVDLKSFKNNLVDII
                     QQNKERWKELAAQEARTSSQKCEFIHQ"
```

```
BASE COUNT      627 a    400 c    437 g    544 t
ORIGIN
        1 gaattctgat gtgcttcagt gcacagaaca gtaacagatg agctgctttt ggggagagct
       61 tgagtactca gtcggagcat catcatgggg tctagtgcca cagagattga agaattggaa
      121 aacaccactt ttaagtatct tacaggagaa cagactgaaa aaatgtggca gcgcctgaaa
      181 ggaatactaa gatgcttggt gaagcagctg gaaagaggtg atgttaacgt cgtcgactta
      241 aagaagaata ttgaatatgc ggcatctgtg ctggaagcag tttatatcga tgaaacaaga
      301 agacttctgg atactgaaga tgagctcagt gacattcaga ctgactcagt cccatctgaa
      361 gtccgggact ggttggcttc tacctttaca cggaaaatgg ggatgacaaa aaagaaacct
      421 gaggaaaaac caaaatttcg gagcattgtg catgctgttc aagctggaat tttgtggaa
      481 agaatgtacc gaaaaacata tcatatggtt ggtttggcat atccagcagc tgtcatcgta
      541 acattaaagg atgttgataa atggtctttc gatgtatttg ccctaaatga agcaagtgga
      601 gagcatagtc tgaagtttat gatttatgaa ctgtttacca gatatgatct tatcaaccgt
      661 ttcaagattc ctgtttcttg cctaatcacc tttgcagaag ctttagaagt tggttacagc
      721 aagtacaaaa atccatatca caatttgatt catgcagctg atgtcactca aactgtgcat
      781 tacataatgc ttcatacagg tatcatgcac tggctcactg aactggaaat tttagcaatg
      841 gtctttgctg ctgccattca tgattatgag catacaggga caacaaacaa ctttcacatt
      901 cagacaaggt cagatgttgc cattttgtat aatgatcgct ctgtccttga gaatcaccac
      961 gtgagtgcag cttatcgact tatgcaagaa gaagaaatga atatcttgat aaatttatcc
     1021 aaagatgact ggagggatct tcggaaccta gtgattgaaa tggttttatc tacagacatg
     1081 tcaggtcact tccagcaaat taaaaatata agaaacagtt tgcagcagcc tgaagggatt
     1141 gacagagcca aaaccatgtc cctgattctc cacgcagcag acatcagcca cccagccaaa
     1201 tcctggaagc tgcattatcg gtggaccatg gccctaatgg aggagttttt cctgcaggga
     1261 gataaagaag ctgaattagg gcttccattt tcccccactt gtgatcggaa gtcaaccatg
     1321 gtggcccagt cacaaatagg tttcatcgat ttcatagtag agccaacatt ttctcttctg
     1381 acagactcaa cagagaaaat tgttattcct cttatagagg aagcctcaaa agccgaaact
     1441 tcttcctatg tggcaagcag ctcaaccacc attgtggggt tacacattgc tgatgcacta
     1501 agacgatcaa atacaaaagg ctccatgagt gatgggtcct attccccaga ctactccctt
     1561 gcagcagtgg acctgaagag tttcaagaac aacctggtgg acatcattca gcagaacaaa
     1621 gagaggtgga aagagttagc tgcacaagaa gcaagaacca gttcacagaa gtgtgagttt
     1681 attcatcagt aaacaccttt aagtaaaacc tcgtgcatgg tggcagctct aatttgacca
     1741 aaagacttgg agattttgat tatgcttgct ggaaatctac cctgtcctgt gtgagacagg
     1801 aaatctattt ttgcagattg ctcaataagc atcatgagcc acataaataa cagctgtaaa
     1861 ctccttaatt caccgggctc aactgctacc gaacagattc atctagtggc tacatcagca
     1921 ccttgtgctt tcagatatct gtttcaatgg cattttgtgg catttgtctt taccgagtgc
     1981 caataaattt tctttgagca aaaaaaaa
//
```

### 3. PDE type 2

```
LOCUS       HSU67733     4240 bp    mRNA            PRI       21-MAY-1997
DEFINITION  Human cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase
            PDE2A3 (PDE2A) mRNA, complete cds.
ACCESSION   U67733
NID         g2108051
VERSION     U67733.1  GI:2108051
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 4240)
  AUTHORS   Rosman,G.J., Martins,T.J., Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A., Ferguson,K.
            and Loughney,K.
  TITLE     Isolation and characterization of human cDNAs encoding a
            cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase
  JOURNAL   Gene 191 (1), 89-95 (1997)
  MEDLINE   97354299
REFERENCE   2  (bases 1 to 4240)
  AUTHORS   Rosman,G.J., Martins,T.J., Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A., Ferguson,K.
            and Loughney,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (21-AUG-1996) Icos Corporation, 22021 20th Ave. S.E.,
            Bothell, WA 98021, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..4240
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            162..2987
                     /gene="PDE2A"
     CDS             162..2987
                     /gene="PDE2A"
                     /function="cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide
                     phosphodiesterase"
                     /note="PDE2 family; splice variant 3"
                     /codon_start=1
                     /product="PDE2A3"
                     /protein_id="AAC51320.1"
                     /db_xref="PID:g2108052"
                     /db_xref="GI:2108052"
                     /translation="MGQACGHSILCRSQQYPAARPAEPRGQQVFLKPDEPPPPPQPCA
                     DSLQDALLSLGSVIDISGLQRAVKEALSAVLPRVETVYTYLLDGESQLVCEDPPHELP
                     QEGKVREAIISQKRLGCNGLGFSDLPGKPLARLVAPLAPDTQVLVMPLADKEAGAVAA
                     VILVHCGQLSDNEEWSLQAVEKHTLVALRRVQVLQQRGPREAPRAVQNPPEGTAEDQK
                     GGAAYTDRDRKILQLCGELYDLDASSLQLKVLQYLQQETRASRCCLLLVSEDNLQLSC
                     KVIGDKVLGEEVSFPLTGCLGQVVEDKKSIQLKDLTSEDVQQLQSMLGCELQAMLCVP
                     VISRATDQVVALACAFNKLEGDLFTDEDEHVIQHCFHYTSTVLTSTLAFQKEQKLKCE
                     CQALLQVAKGLFTKLQDVSVLLQEIITEARNLSNAEICSVFLLDQNELVAKVFDGGVV
                     DDESYEIRIPADQGIAGHVATTGQILNIPDAYAHPLFYRGVDDSTGFRTRNILCFPIK
                     NENQEVIGVAELVNKINGPWFSKFDEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHL
                     ANEMMNYEMKVSDDEYTKLLNDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQ
                     DMNFINNYKIDCPTLARFCLMVKKGYRDPPYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLE
                     DIEIFALFISCMCHDLDHRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSVMERHHFAQAIAILNT
                     HGCNIFDHFSRKDYQRMLDLMRDIILATDLAHHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHHRL
                     LLCLLMTSCDLSDQTKGWKTTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIP
                     ELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNREHWTKVSHKFTIRGLPSNNSLD
                     FLDEEYEVPDLDGTRAPINGCCSLDAE"
BASE COUNT      902 a   1260 c   1202 g    876 t
ORIGIN
        1 cagcagagct ggattggggt gttgagtcca ggctgagtag gggcagccc actgctcttg
       61 gtccctgtgc ctgctggggg tgccctgccc tgaactccag gcagcgggga cagggcgagg
      121 tgccacctta gtctggctgg ggaggcggac gatgaggagt gatggggcag gcatgcggcc
      181 actccatcct ctgcaggagc cagcagtacc cggcagcgcg accggctgag ccgcggggcc
      241 agcaggtctt cctcaagccg gacgagccgc cgccgccgcc gcagccatgc gccgacagcc
      301 tgcaggacgc cttgctgagt ctgggctctg tcatcgacat ttcaggcctg caacgtgctg
      361 tcaaggaggc cctgtcagct gtgctccccc gagtggaaac tgtctacacc tacctactgg
      421 atggtgagtc ccagctggtg tgtgaggacc ccccacatga gctgccccag gaggggaaag
      481 tccgggaggc tatcatctcc cagaagcggc tgggctgcaa tgggctgggc ttctcagacc
      541 tgccagggaa gcccttggcc aggctggtgg ctccactggc tcctgatacc caagtgctgg
      601 tcatgccgct agcggacaag gaggctgggg ccgtggcagc tgtcatcttg gtgcactgtg
      661 gccagctgag tgataatgag gaatggagcc tgcaggcggt ggagaagcat accctggtcg
      721 ccctgcggag ggtgcaggtc ctgcagcagc gcgggcccag ggaggctccc cgagccgtcc
      781 agaacccccc ggaggggacg gcggaagacc agaagggcgg ggcggcgtac accgaccgcg
      841 accgcaagat cctccaactg tgcggggaac tctacgacct ggatgcctct tccctgcagc
      901 tcaaagtgct ccaatacctg cagcaggaga cccgggcatc ccgctgctgc ctcctgctgg
      961 tgtcggagga caatctccag ctttcttgca aggtcatcgg agacaaagtg ctcggggaag
     1021 aggtcagctt tcccttgaca ggatgcctgg gccaggtggt ggaagacaag aagtccatcc
     1081 agctgaagga cctcacctcc gaggatgtac aacagctgca gagcatgttg ggctgtgagc
     1141 tgcaggccat gctctgtgtc cctgtcatca gccgggccac tgaccaggtg gtggccttgg
     1201 cctgcgcctt caacaagcta gaaggagact tgttcaccga cgaggacgag catgtgatcc
     1261 agcactgctt ccactacacc agcaccgtgc tcaccagcac cctggccttc cagaaggaac
     1321 agaaactcaa gtgtgagtgc caggctcttc tccaagtggc aaagaacctc ttcacccacc
     1381 tggatgacgt ctctgtcctg ctccaggaga tcatcacgga ggccagaaac ctcagcaacg
     1441 cagagatctg ctctgtgttc ctgctggatc agaatgagct ggtggccaag gtgttcgacg
     1501 gggcgtggt ggatgatgag agctatgaga tccgcatccc ggccgatcag ggcatcgcgg
     1561 gacacgtggc gaccacgggc cagatcctga acatccctga cgcatatgcc catccgcttt
     1621 tctaccgcgg cgtggacgac agcaccggct tccgcacgcg caacatcctc tgcttcccca
     1681 tcaagaacga gaaccaggag gtcatcggtg tggccgagct ggtgaacaag atcaatgggc
     1741 catggttcag caagttcgac gaggacctgg cgacggcctt ctccatctac tgcggcatca
     1801 gcatcgccca ttctctccta tacaaaaaag tgaatgaggc tcagtatcgc agccacctgg
     1861 ccaatgagat gatgatgtac cacatgaagg tctccgacga tgagtatacc aaacttctcc
     1921 atgatgggat ccagcctgtg gctgccattg actccaattt tgcaagtttc acctataccc
     1981 ctcgttccct gcccgaggat gacacgtcca tggccatcct gagcatgctg caggacatga
     2041 atttcatcaa caactacaaa attgactgcc cgaccctggc ccggttctgt ttgatggtga
     2101 agaagggcta ccgggatccc ccctaccaca actggatgca cgcctttctct gtctcccact
     2161 tctgctacct gctctacaag aacctggagc tcaccaacta cctcgaggac atcgagatct
     2221 ttgccttgtt tatttcctgc atgtgtcatg acctggacca cagaggcaca aacaactctt
     2281 tccaggtggc ctcgaaatct gtgctggctg cgctctacag ctctgagggc tccgtcatgg
```

2341 agaggcacca ctttgctcag gccatcgcca tcctcaacac ccacggctgc aacatctttg
2401 atcatttctc ccggaaggac tatcagcgca tgctggatct gatgcgggac atcatcttgg
2461 ccacagacct ggcccaccat ctccgcatct tcaaggacct ccagaagatg gctgaggtgg
2521 gctacgaccg aaacaacaag cagcaccaca gacttctcct ctgcctcctc atgacctcct
2581 gtgacctctc tgaccagacc aagggctgga agactacgag aaagatcgcg gagctgatct
2641 acaaagaatt cttctcccag ggagacctgg agaaggccat gggcaacagg ccgatggaga
2701 tgatggaccg ggagaaggcc tatatccctg agctgcaaat cagcttcatg gagcacattg
2761 caatgcccat ctacaagctg ttgcaggacc tgttccccaa agcggcagag ctgtacgagc
2821 gcgtggcctc caaccgtgag cactggacca aggtgtccca caagttcacc atccgcggcc
2881 tcccaagtaa caactcgctg gacttcctgg atgaggagta cgaggtgcct gatctggatg
2941 gcactagggc cccatcaat ggctgctgca gccttgatgc tgagtgatcc cctccaggac
3001 acttccctgc ccaggccacc tcccacagcc ctccactggt ctggccagat gcactgggaa
3061 cagagccacg ggtcctgggt cctagaccag gacttcctgt gtgaccctgg acaagtacta
3121 ccttcctggg cctcagcttt ctcgtctgta taatggaagc aagacttcca acctcacgga
3181 gactttgtaa tttgcttctc tgagagcaca ggggtgacca atgagcagtg ggccctactc
3241 tgcacctctg accacacctt ggcaagtctt tcccaagcca ttctttgtct gagcagcttg
3301 atggtttctc cttgccccat ttctgcccca ccagatcttt gctcctttcc ctttgaggac
3361 tcccaccctt tgggtctcca ggatcctcat ggaaggggaa ggtgagacat ctgagtgagc
3421 agagtgtggc atcttggaaa cagtccttag ttctgtggga ggactagaaa cagccgcggc
3481 gaaggccccc tgaggaccac tactatactg atggtgggat tgggacctgg gggatacagg
3541 ggccccagga agaagctggc cagaggggca gctcagtgct ctgcagagag ggggccctggg
3601 gagaagcagg atgggattga tgggcaggag ggatccccgc actgggagac aggcccaggt
3661 atgaatgagc cagccatgct tcctcctgcc tgtgtgacgc tgggcgagtc tcttcccctg
3721 tctgggccaa acagggagcg ggtaagacaa tccatgctct aagatccatt ttagatcaat
3781 gtctaaaata gctctatggc tctgcggagt cccagcagag gctatggaat gtttctgcaa
3841 ccctaaggca cagagagcca accctgagtg tctcagaggc cccctgagtg ttccccttgg
3901 cctgagcccc ttacccattc ctgcagccag tgagagacct ggcctcagcc tggcagcgct
3961 ctcttcaagg ccatatccac ctgtgccctg ggcttggga gaccccatag gccgggactc
4021 ttgggtcagc ccgccactgg cttctctctt tttctccgtt tcattctgtg tgcgttgtgg
4081 ggtgggggag gggtccacc tgccttacct ttctgagttg cctttagaga gatgcgtttt
4141 tctaggactc tgtgcaactg tcgtatatgg tcccgtgggc tgaccgcttt gtacatgaga
4201 ataaatctat ttctttctac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa

## 4. NPY

```
LOCUS       HUMNPY         551 bp    mRNA            PRI       07-JAN-1995
DEFINITION  Human neuropeptide Y (NPY) mRNA, complete cds.
ACCESSION   K01911
NID         g189273
VERSION     K01911.1  GI:189273
KEYWORDS    neuropeptide Y.
SOURCE      Human pheochromocytoma, cDNA to mRNA, clone pNPY3-75.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 551)
  AUTHORS   Minth,C.D., Bloom,S.R., Polak,J.M. and Dixon,J.E.
  TITLE     Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA
            encoding neuropeptide tyrosine
  JOURNAL   Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 (14), 4577-4581 (1984)
  MEDLINE   84272678
COMMENT     Neuropeptide Y (NPY) is one of the most abundant peptides in the
            mammalian nervous system, and its extensive distribution suggests a
            neuro-transmitter or -modulator role. NPY is also found in some
            chromaffin cells of the adrenal medulla.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..551
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /tissue_type="pheochromocytoma"
                     /map="7pter-q22"
     mRNA            <1..551
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
     gene            1..551
                     /gene="NPY"
     sig_peptide     87..170
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
     CDS             87..380
                     /gene="NPY"
                     /codon_start=1
                     /db_xref="GDB:G00-119-456"
                     /product="neuropeptide Y"
                     /protein_id="AAA59944.1"
                     /db_xref="PID:g189274"
                     /db_xref="GI:189274"
                     /translation="MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAED
                     MARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRLEDPAMW"
     mat_peptide     171..278
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
```

1105

```
                     /product="neuropeptide Y"
BASE COUNT      131 a    171 c    129 g    120 t
ORIGIN      51 bp upstream of RsaI site.
        1 accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc
       61 ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgactgggg ctgtccggac
      121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgaggcg taccccctcca
      181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
      241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
      301 cactgatttc agacctcttg atgagagaaa gcacagaaaa tgttcccaga actcggcttg
      361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
      421 gcccatattt catcgtgtaa aacgagaatc cacccatcct accaatgcat gcagccactg
      481 tgctgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
      541 atcatgcatt c
```

## 5. NPY Y1 Receptor

```
LOCUS       A26481       2624 bp    mRNA            PAT       17-OCT-1995
DEFINITION  Human NPY receptor Y1 gene cDNA.
ACCESSION   A26481
NID         g1247452
VERSION     A26481.1  GI:1247452
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
            Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2624)
  AUTHORS   .
  TITLE     HUMAN NEUROPEPTIDE Y-Y1 RECEPTOR
  JOURNAL   Patent: WO 9309227-A 3 13-MAY-1993;
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2624
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     CDS             152..1306
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y Y1 receptor"
                     /protein_id="CAA01819.1"
                     /db_xref="PID:e205126"
                     /db_xref="PID:g1247453"
                     /db_xref="GI:1247453"
                     /db_xref="SWISS-PROT:P25929"
                     /translation="MNSTLFSQVENHSVHSNFSEKNAQLLAFENDDCHLPLAMIFTLA
                     LAYGAVIILGVSGNLALIIIILKQKEMRNVTNILIVNLSFSDLLVAIMCLPFTFVYTL
                     MDHWVFGEAMCKLNPFVQCVSITVSIFSLVLIAVERHQLIINPRGWRPNNRHAYVGIA
                     VIWVLAVASSLPFLIYQVMTDEPFQNVTLDAYKDKYVCFDQFPSDSHRLSYTTLLLVL
                     QYFGPLCFIFICYFKIYIRLKRRNNMMDKMRDNKYRSSETKRINIMLLSIVVAFAVCW
                     LPLTIFNTVFDWNHQIIATCNHNLLFLLCHLTAMISTCVNPIFYGFLNKNFQRDLQFF
                     FNFCDFRSRDDDYETIAMSTMHTDVSKTSLKQASPVAFKKINNNDDNEKI"
BASE COUNT      791 a    479 c    473 g    878 t      3 others
ORIGIN
        1 attgttcagt tcaagggaat gaagaattca gaataatttt ggtaaatgga ttccaatatc
       61 gggaataaga ataagctgaa cagttgacct gctttgaaga aacatactgt ccatttgtct
      121 aaaataatct ataacaacca aaccaatcaa aatgaattca acattatttt cccaggttga
      181 aaatcattca gtccactcta atttctcaga gaagaatgcc cagcttctgg cttttgaaaa
      241 tgatgattgt catctgccct tggccatgat atttacctta gctcttgctt atggagctgt
      301 gatcattctt ggtgtctctg gaaacctggc cttgatcata atcatcttga aacaaaagga
      361 gatgagaaat gttaccaaca tcctgattgt gaacctttcc ttctcagact tgcttgttgc
      421 catcatgtgt ctccccttta catttgtcta cacattaatg gaccactggg tctttggtga
      481 ggcgatgtgt aagttgaatc cttttgtgca atgtgtttca atcactgtgt ccattttctc
      541 tctggttctc attgctgtgg aacgacatca gctgataatc aaccctcgag ggtggagacc
      601 aaataataga catgcttatg taggtattgc tgtgatttgg gtccttgctg tggcttcttc
      661 tttgcctttc ctgatctacc aagtaatgac tgatgagccg ttccaaaatg taacacttga
```

406

1106

721 tgcgtacaaa gacaaatacg tgtgctttga tcaatttcca tcggactctc ataggttgtc
781 ttataccact ctcctcttgg tgctgcagta ttttggtcca ctttgtttta tatttatttg
841 ctacttcaag atatatatac gcctaaaaag gagaaacaac atgatggaca agatgagaga
901 caataagtac aggtccagtg aaaccaaaag aatcaatatc atgctgctct ccattgtggt
961 agcatttgca gtctgctggc tccctcttac catctttaac actgtgtttg attggaatca
1021 tcagatcatt gctacctgca accacaatct gttattcctg ctctgccacc tcacagcaat
1081 gatatccact tgtgtcaacc ccatatttta tgggttcctg aacaaaaact tccagagaga
1141 cttgcagttc ttcttcaact tttgtgattt ccggtctcgg gatgatgatt atgaaacaat
1201 agccatgtcc acgatgcaca cagatgtttc caaaacttct ttgaagcaag caagcccagt
1261 cgcatttaaa aaaatcaaca acaatgatga taatgaaaaa atctgaaact acttatagcc
1321 tatggtcccg gatgacatct gtttaaaaac aagcacaacc tgcaacatac tttgattacc
1381 tgttctccca aggaatgggg ttgaaatcat ttgaaaatga ctaagatttt cttgtcttgc
1441 tttttttactg cttttgttgt agtgtcataa ttacatttgg aacaaaaggt gtgggctttg
1501 gggtcttctg gaaatagttt tgaccagaca tctttgaagt gcttttttgtg aatttatgca
1561 tataatataa agacttttat actgtactta ttggaatgaa atttctttaa agtattacga
1621 tnnnctgact tcagaagtac ctgccatcca atacggtcat tagattgggt catcttgatt
1681 agattagatt agattagatt gtcaacagat tgggccatcc ttactttatg ataggcatca
1741 ttttagtgtg ttacaatagt aacagtatgc aaaagcagca ttcaggagcc gaaagatagt
1801 cttgaagtca ttcagaagtg gtttgaggtt tctgtttttt ggtggttttt gtttgttttt
1861 ttttttttc accttaaggg aggctttcat ttcctcccga ctgattgtca cttaaatcaa
1921 aatttaaaaa tgaataaaaa gacatacttc tcagctgcaa atattatgga gaattgggca
1981 cccacaggaa tgaagagaga aagcagctcc ccaacttcaa aaccattttg gtacctgaca
2041 acaagagcat tttagagtaa ttaatttaat aaagtaaatt agtattgctg caaatagcta
2101 aattatattt atttgaattg atggtcaaga gattttccat ttttttaca gactgttcag
2161 tgtttgtcaa gcttctggtc taatatgtac tcgaaagact ttccgcttac aatttgtaga
2221 aacacaaata tcgttttcca tacagcagtg cctatatagt gactgatttt aactttcaat
2281 gtccatcttt caaaggaagt aacaccaagg tacaatgtta aaggaatatt cactttacct
2341 agcagggaaa aatacacaaa aactgcagat acttcatata gcccatttta acttgtataa
2401 actgtgtgac ttgtggcgtc ttataaataa tgcactgtaa agattactga atagttgtgt
2461 catgttaatg tgcctaattt catgtatctt gtaatcatga ttgagcctca gaatcatttg
2521 gagaaactat attttaaaga acaagacata cttcaatgta ttatacagat aaagtattac
2581 atgtgtttga ttttaaaagg gcggacattt tattaaaatc aagg

## 6. NPY Y2 Receptor

```
LOCUS       HSU36269     1200 bp    mRNA            PRI       14-NOV-1995
DEFINITION  Human neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor mRNA, complete cds.
ACCESSION   U36269
NID         g1063633
VERSION     U36269.1  GI:1063633
KEYWORDS    .
SOURCE      Human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1200)
  AUTHORS   Gerald,C., Walker,M.W., Vaysse,P.J., He,C., Branchek,T.A. and
            Weinshank,R.L.
  TITLE     Expression cloning and pharmacological characterization of a human
            hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 270 (45), 26758-26761 (1995)
  MEDLINE   96070760
REFERENCE   2  (bases 1 to 1200)
  AUTHORS   Gerald,C.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (13-SEP-1995) Christophe A. Gerald, Synaptic
            Pharmaceutical Corporation, Molecular Biology, 215 College Road,
            Paramus, NJ 07652, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1200
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /clone="hhY2"
                     /sex="male"
                     /tissue_type="brain hippocampus"
                     /dev_stage="adult"
     5'UTR           1..20
     CDS             21..1166
                     /note="NPY/PYY Y2 receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor"
                     /protein_id="AAC50281.1"
                     /db_xref="PID:g1063634"
                     /db_xref="GI:1063634"
                     /translation="MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGPQTTPRGELVPDPEPELIDST
                     KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTL
                     CLPFTLTYTLMGEWKMGPVLCHLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKI
                     SKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEKSIYGTV
                     YSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAANDHYHQRRQKTTKMLVCVVVV
                     FAVSWLPLHAFQLAVDIDSQVLDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRK
                     AFLSAFRCEQRLDAIHSEVSVTFKAKKNLEVRKNSGPNDSFTEATNV"
     3'UTR           1164..1200
```

1107

```
BASE COUNT      292 a    295 c    299 g    314 t
ORIGIN
        1 caagtggacc tgtactgaaa atgggtccaa taggtgcaga ggctgatgag aaccagacag
       61 tggaagaaat gaaggtggaa caatacgggc cacaaacaac tcctagaggt gaactggtcc
      121 ctgaccctga gccagagctt atagatagta ccaagctgat tgaggtacaa gttgttctca
      181 tattggccta ctgctccatc atcttgcttg gggtaattgg caactccttg gtgatccatg
      241 tggtgatcaa attcaagagc atgcgcacag taaccaactt tttcattgcc aatctggctg
      301 tggcagatct tttggtgaac actctgtgtc taccgttcac tcttacctat accttaatgg
      361 gggagtggaa aatgggtcct gtcctgtgcc acctggtgcc ctatgcccag ggcctggcag
      421 tacaagtatc cacaatcacc ttgacagtaa ttgccctgga ccggcacagg tgcatcgtct
      481 accacctaga gagcaagatc tccaagcgaa tcagcttcct gattattggc ttggcctggg
      541 gcatcagtgc cctgctggca agtcccctgg ccatcttccg ggagtattcg ctgattgaga
      601 tcatcccgga ctttgagatt gtggcctgta ctgaaaagtg gcctggcgag gagaagagca
      661 tctatggcac tgtctatagt ctttcttcct tgttgatctt gtatgttttg cctctgggca
      721 ttatatcatt ttcctacact cgcatttgga gtaaattgaa gaaccatgtc agtcctggag
      781 ctgcaaatga ccactaccat cagcgaaggc aaaaaaccac caaaatgctg gtgtgtgtgg
      841 tggtggtgtt tgcggtcagc tggctgcctc tccatgcctt ccagcttgcc gttgacattg
      901 acagccaggt cctggacctg aaggagtaca aactcatctt cacagtgttc cacatcatcg
      961 ccatgtgctc cacttttgcc aatccccttc tctatggctg gatgaacagc aactacagaa
     1021 aggctttcct ctcggccttc cgctgtgagc agcggttgga tgccattcac tctgaggtgt
     1081 ccgtgacatt caaggctaaa aagaacctgg aggtcagaaa gaacagtggc cccaatgact
     1141 ctttcacaga ggctaccaat gtctaaggaa gctgtggtgt gaaaatgtat ggatgaattc
```

## 7. NPY Y5 Receptor

```
LOCUS       HSU66275     1370 bp    mRNA            PRI       18-OCT-1996
DEFINITION  Human neuropeptide Y5 receptor (NPYR5) mRNA, complete cds.
ACCESSION   U66275
NID         g1620655
VERSION     U66275.1  GI:1620655
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1370)
  AUTHORS   Hu,Y., Bloomquist,B.T., Cornfield,L.J., DeCarr,L.B.,
            Flores-Riveros,J.R., Friedman,L., Jiang,P., Lewis-Higgins,L.,
            Sadlowski,Y., Schaefer,J., Velazquez,N. and McCaleb,M.L.
  TITLE     Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor
            associated with feeding behavior
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 271 (42), 26315-26319 (1996)
  MEDLINE   96421636
REFERENCE   2  (bases 1 to 1370)
  AUTHORS   Hu,Y., Bloomquist,B.T., Cornfield,L.J., DeCarr,L.B.,
            Flores-Riveros,J.R., Friedman,L., Jiang,P., Lewis-Higgins,L.,
            Sadlowski,Y., Schaefer,J., Velazquez,N. and McCaleb,M.L.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-AUG-1996) Metabolic Disorders, Bayer Corporation, 400
            Morgan Lane, West Haven, CT 06516, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1370
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            18..1355
                     /gene="NPYR5"
     CDS             18..1355
                     /gene="NPYR5"
                     /function="G protein-coupled receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y5 receptor"
                     /protein_id="AAC50741.1"
                     /db_xref="PID:g1620656"
                     /db_xref="GI:1620656"
                     /translation="MDLELDEYYNKTLATENNTAATRNSDFPVWDDYKSSVDDLQYFL
                     IGLYTFVSLLGFMGNLLILMALMKKRNQKTTVNFLIGNLAFSDILVVLFCSPFTLTSV
                     LLDQWMFGKVMCHIMPFLQCVSVLVSTLILISIAIVRYHMIKHPISNNLTANHGYFLI
                     ATVWTLGFAICSPLPVFHSLVELQETFGSALLSSRYLCVESWPSDSYRIAFTISLLLV
                     QYILPLVCLTVSHTSVCRSISCGLSNKENRLEENEMINLTLHPSKKSGPQVKLSGSHK
                     WSYSFIKKHRRRYSKKTACVLPAPERPSQENHSRILPENFGSVRSQLSSSSKFIPGVP
                     TCFEIKPEENSDVHELRVKRSVTRIKKRSRSVFYRLTILILVFAVSWMPLHLFHVVTD
                     FNDNLISNRHFKLVYCICHLLGMMSCCLNPILYGFLNNGIKADLVSLIHCLHM"
```

```
BASE COUNT      392 a    263 c    257 g    458 t
ORIGIN
        1 ccaagcagga ctataatatg gatttagagc tcgacgagta ttataacaag acacttgcca
       61 cagagaataa tactgctgcc actcggaatt ctgatttccc agtctgggat gactataaaa
      121 gcagtgtaga tgacttacag tattttctga ttgggctcta tacatttgta agtcttcttg
      181 gctttatggg gaatctactt attttaatgg ctctcatgaa aaagcgtaat cagaagacta
      241 cggtaaactt cctcataggc aatctggcct tttctgatat cttggttgtg ctgttttgct
      301 cacctttcac actgacgtct gtcttgctgg atcagtggat gtttggcaaa gtcatgtgcc
      361 atattatgcc ttttcttcaa tgtgtgtcag ttttggtttc aactttaatt ttaatatcaa
      421 ttgccattgt caggtatcat atgataaaac atcccatatc taataattta acagcaaacc
      481 atggctactt tctgatagct actgtctgga cactaggttt tgccatctgt tctccccttc
      541 cagtgtttca cagtcttgtg gaacttcaag aaacatttgg ttcagcattg ctgagcagca
      601 ggtatttatg tgttgagtca tggccatctg attcatacag aattgccttt actatctctt
      661 tattgctagt tcagtatatt ctgcccttag tttgtcttac tgtaagtcat acaagtgtct
      721 gcagaagtat aagctgtgga ttgtccaaca aagaaaacag acttgaagaa aatgagatga
      781 tcaacttaac tcttcatcca tccaaaaaga gtgggcctca ggtgaaactc tctggcagcc
      841 ataaatggag ttattcattc atcaaaaaac acagaagaag atatagcaag aagacagcat
      901 gtgtgttacc tgctccagaa agaccttctc aagagaacca ctccagaata cttccagaaa
      961 actttggctc tgtaagaagt cagctctctt catccagtaa gttcatacca ggggtcccca
     1021 cttgctttga gataaaacct gaagaaaatt cagatgttca tgaattgaga gtaaaacgtt
     1081 ctgttacaag aataaaaaag agatctcgaa gtgttttcta cagactgacc atactgatat
     1141 tagtatttgc tgttagttgg atgccactac accttttcca tgtggtaact gattttaatg
     1201 acaatcttat ttcaaatagg catttcaagt tggtgtattg catttgtcat ttgttgggca
     1261 tgatgtcctg ttgtcttaat ccaattctat atgggtttct taataatggg attaaagctg
     1321 atttagtgtc ccttatacac tgtcttcata tgtaataatt ctcactgttt
```

## 8. VIP

```
LOCUS       VIP          1511 bp    mRNA            PRI       19-MAR-1999
DEFINITION  Homo sapiens vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA.
ACCESSION   NM_003381
NID         g4507896
VERSION     NM_003381.1  GI:4507896
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1511)
  AUTHORS   DeLamarter,J.F., Buell,G.N., Kawashima,E., Polak,J.M. and
            Bloom,S.R.
  TITLE     Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in
            bacterial cells
  JOURNAL   Peptides 6 Suppl 1, 95-102 (1985)
  MEDLINE   86016352
COMMENT     REFSEQ: This reference sequence was derived from M36634.
            PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
            that has not yet been subject to human review. The final curated
            reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1511
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579
                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
```

1109

```
     polyA_signal    1326..1331
BASE COUNT      541 a    255 c    276 g    439 t
ORIGIN
        1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
       61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
      121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
      181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
      241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
      301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
      361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
      421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
      481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
      541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
      601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
      661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaatat
      721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
      781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
      841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
      901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
      961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
     1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
     1081 ataaaaagac attcttccaa aaagattttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
     1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
     1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
     1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
     1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
     1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
     1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
     1501 aaaaaaaaaa a
```

## 9. VPAC1 Receptor

```
LOCUS       VIP          1511 bp    mRNA            PRI       19-MAR-1999
DEFINITION  Homo sapiens vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA.
ACCESSION   NM_003381
NID         g4507896
VERSION     NM_003381.1  GI:4507896
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1511)
  AUTHORS   DeLamarter,J.F., Buell,G.N., Kawashima,E., Polak,J.M. and
            Bloom,S.R.
  TITLE     Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in
            bacterial cells
  JOURNAL   Peptides 6 Suppl 1, 95-102 (1985)
  MEDLINE   86016352
COMMENT     REFSEQ: This reference sequence was derived from M36634.
            PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
            that has not yet been subject to human review. The final curated
            reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1511
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579
                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
```

```
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331
BASE COUNT      541 a    255 c    276 g    439 t
ORIGIN
        1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
       61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
      121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
      181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
      241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
      301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
      361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
      421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
      481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
      541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
      601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
      661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
      721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
      781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
      841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
      901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
      961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
     1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
     1081 ataaaaagac attcttccaa aaagattttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
     1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
     1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
     1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
     1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
     1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
     1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
     1501 aaaaaaaaaa a
```

## 10. VPAC2 Receptor

```
LOCUS       HUMHVRP      1640 bp    mRNA            PRI       16-FEB-1995
DEFINITION  Human helodermin-preferring VIP receptor (VIP2/PACAP receptor)
            mRNA, complete cds.
ACCESSION   L36566
NID         g550477
VERSION     L36566.1  GI:550477
KEYWORDS    PACAP receptor; VIP receptor; helodermin-preferring VIP receptor.
SOURCE      Homo sapiens cDNA to mRNA.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1640)
  AUTHORS   Svoboda,M., Tastenoy,M., Van Rampelbergh,J., Goossens,J.F., De
            Neef,P., Waelbroeck,M. and Robberecht,P.
  TITLE     Molecular cloning and functional characterization of a human VIP
            receptor from SUP-T1 lymphoblasts
  JOURNAL   Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (3), 1617-1624 (1994)
  MEDLINE   95110300
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1640
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_line="SUP T1 lymphoblast"
                     /clone_lib="lamda ZAP II"
     sig_peptide     163..231
                     /note="putative; putative"
     CDS             163..1479
                     /note="human VIP2 receptor was previously called
                     'helodermin-preferring VIP receptor'; transmembrane
                     domains are located at positions: 637-696; 772-844;
                     880-948; 1003-1071; 1147-1209; 1243-1302.; Potential
                     glycosylation sites are located at :334-336; 424-426;
                     436-438."
                     /codon_start=1
                     /function="VIP and PACAP receptor"
                     /protein_id="AAC37569.1"
                     /db_xref="PID:g550478"
                     /db_xref="GI:550478"
                     /translation="MRTLLPPALLTCWLLAPVNSIHPECRFHLEIQEEETKCTELLRS
                     QTEKHKACSGVWDNITCWRPANVGETVTVPCPKVFSNFYSKAGNISKNCTSDGWSETF
                     PDFVDACGYSDPEDESKITFYILVKAIYTLGYSVSLMSLATGSIILCLFRKLHCTRNY
                     IHLNLFLSFILRAISVLVKDDVLYSSSGTLHCPDQPSSWVGCKLSLVFLQYCIMANFF
                     WLLVEGLYLHTLLVAMLPPRRCFLAYLLIGWGLPTVCIGAWTAARLYLEDTGCWDTND
                     HSVPWWVIRIPILISIIVNFVLFISIIRILLQKLTSPDVGGNDQSQYKRLAKSTLLLI
                     PLFGVHYMVFAVFPISISSKYQILFELCLGSFQGLVVAVLYCFLNSEVQCELKRKWRS
                     RCPTPSASRDYRVCGSSFSRNGSEGALQFHRASRAQSFLQTETSVI"
     mat_peptide     232..1476
```

```
                    /function="VIP and PACAP receptor"
BASE COUNT      315 a    512 c    461 g    352 t
ORIGIN
        1 cgggacgagg gggcggcccc cgcgctcggg gcgctcggct acagctgcgg ggcccgaggt
       61 ctccgcgcac tcgctcccgg cccatgctgg aggcggcgga acccggggga cctaggacgg
      121 aggcggcggg cgctgggcgg cccccggcac gctgagctcg ggatgcggac gctgctgcct
      181 cccgcgctgc tgacctgctg gctgctcgcc cccgtgaaca gcattcaccc agaatgccga
      241 tttcatctgg aaatacagga ggaagaaaca aaatgtacag agcttctgag gtctcaaaca
      301 gaaaaacaca aagcctgcag tggcgtctgg gacaacatca cgtgctggcg gcctgccaat
      361 gtgggagaga ccgtcacggt gccctgccca aaagtcttca gcaattttta cagcaaagca
      421 ggaaacataa gcaaaaactg tacgagtgac ggatggtcag agacgttccc agatttcgtc
      481 gatgcctgtg gctacagcga cccggaggat gagagcaaga tcacgtttta tattctggtg
      541 aaggccattt ataccctggg ctacagtgtc tctctgatgt ctcttgcaac aggaagcata
      601 attctgtgcc tcttcaggaa gctgcactgc accaggaatt acatccacct gaacctgttc
      661 ctgtccttca tcctgagagc catctcagtg ctggtcaagg acgacgttct ctactccagc
      721 tctggcacgt tgcactgccc tgaccagcca tcctcctggg tgggctgcaa gctgagcctg
      781 gtcttcctgc agtactgcat catggccaac ttcttctggc tgctggtgga ggggctctac
      841 ctccacaccc tcctggtggc catgctcccc cctagaaggt gcttcctggc ctacctcctg
      901 atcggatggg gcctccccac cgtctgcatc ggtgcatgga ctgcggccag gctctactta
      961 gaagacaccg gttgctggga tacaaacgac cacagtgtgc cctggtgggt catacgaata
     1021 ccgattttaa tttccatcat cgtcaatttt gtcctttttca ttagtattat acgaattttg
     1081 ctgcagaagt taacatcccc agatgtcggc ggcaacgacc agtctcagta caagaggctg
     1141 gccaagtcca cgctcctgct tatcccgctg ttcggcgtcc actacatggt gtttgccgtg
     1201 tttcccatca gcatctcctc caaataccag atactgtttg agctgtgcct cgggtcgttc
     1261 cagggcctgg tggtggccgt cctctactgt ttcctgaaca gtgaggtgca gtgcgagctg
     1321 aagcgaaaat ggcgaagccg gtgcccgacc ccgtccgcga gccgggatta cagggtctgc
     1381 ggttcctcct tctcccacaa cggctcggag ggcgccctgc agttccaccg cgcgtcccga
     1441 gcccagtcct tcctgcaaac ggagacctcg gtcatctagc cccacccctg cctgtcggac
     1501 gcggcgggag gcccacggtt cggggcttct gcggggctga gacgccggct tcctccttcc
     1561 agatgcccga gcaccgtgtc gggcaggtca gcgcggtcct gactccgtca agctggttgt
     1621 ccactaaacc ccatacctgg
```

## ABBREVIATIONS

FSD = female sexual dysfunction
FSAD = female sexual arousal disorder

cAMP = cyclic adenosine-3',5'-monophosphate
cGMP = cyclic guanosine-3',5'-monophosphate

$P_{cAMP}$ = potentiator of cAMP
$P_{cGMP}$ = potentiator of cGMP

$A_{cAMP}$ = activator of cAMP
$A_{cGMP}$ = activator of cGMP

$AM_{cAMP}$ = adverse modulator of cAMP
$AM_{cGMP}$ = adverse modulator of cGMP

$I_{cAMP}$ = inhibitor of cAMP
$I_{cGMP}$ = inhibitor of cGMP
$I{:}I_{cAMP}$ = inhibitor of an inhibitor of cAMP
$I{:}I_{cGMP}$ = inhibitor of an inhibitor of cGMP
$I{:}AM_{cAMP}$ = inhibitor of an adverse modulator of cAMP
$I{:}AM_{cGMP}$ = inhibitor of an adverse modulator of cGMP
$U{:}A_{cAMP}$ = upregulator of activator of cAMP
$U{:}A_{cGMP}$ = upregulator of activator of cGMP

AC = adenylate cyclase
A:AC = activator of AC

NEP = neutral endopeptidase
I:NEP = inhibitor of NEP

VIP = vasoactive intestinal peptide
VIPr = receptor of VIP (may be expressed as VIPR)
$VIP_n$ = receptor sub-type of VIP (such as VIPR1, VIPR2)
A:VIPr = activator of VIPr
$A{:}VIP_n$ = activator of $VIP_n$

I:VIPr = inhibitor of VIPr
I:VIP$_n$ = inhibitor of VIP$_n$
I:I:VIPr = inhibitor of an inhibitor of VIPr
I:I:VIP$_n$ = inhibitor of an inhibitor of VIP$_n$

PDE = phosphodiesterase
PDEn = PDE family (e.g. PDE1, PDE2 etc.)
PDE$_{cAMP}$ = PDE capable of hydrolysing cAMP
PDE$_{cGMP}$ = PDE capable of hydrolysing cGMP
I:PDE$_{cAMP}$ = inhibitor of a PDE capable of hydrolysing cAMP
I:PDE$_{cAMP}$ = inhibitor of a PDE family capable of hydrolysing cAMP

NPY = neuropeptide Y
NPYr = receptor of NPY (may be expressed as NPYR)
NPY Y$_n$ = Y$_n$ receptor sub-type of NPY (e.g. NPY Y$_1$) (e.g. NPYR1)
I:NPY = inhibitor of NPY
I:NPY Y$_n$ = inhibitor of NPY Y$_n$

kDa = kilodalton
bp = base pair
kb = kilobase pair

## CLAIMS

1. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, preferably FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

2. A pharmaceutical composition according to claim 1 wherein the agent is a mediator of vaginal vasorelaxation.

3. A pharmaceutical composition according to claim 1 or claim 2 wherein the composition is for oral administration.

4. Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, preferably FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD.

5. Use according to claim 4 wherein the agent is a mediator of vaginal vasorelaxation.

6. Use according to claim 4 or claim 5 wherein the medicament is for oral administration.

7. A method of treating a female (such as a female suffering from FSD, preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

8. A method according to claim 7 wherein the agent is a mediator of vaginal vasorelaxation.

9. A method according to claim 7 or claim 8 wherein the agent is orally administered.

10. An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, preferably FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, preferably FSAD.

11. A process comprising the steps of:

(a) performing the assay according to claim 10;

(b) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP; and

(c) preparing a quantity of those one or more identified agents.

12. A method of treating FSD, preferably FSAD, by potentiating *in vivo* cAMP with an agent;

wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP in an *in vitro* assay method;

wherein the *in vitro* assay method is the assay method defined in claim 10.

13. Use of an agent in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of FSD, preferably FSAD, the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP when assayed *in vitro* by the assay method according to claim 10.

14. An agent identified by the assay method according to claim 10.

15. An agent according to claim 14 for use in medicine.

16. An agent according to claim 14 for use in treating FSD, preferably FSAD.

17. A medicament for oral administration to treat FSD, preferably FSAD, wherein the medicament comprises the agent according to claim 14.

18. A diagnostic method, the method comprising isolating a sample from a female; determining whether the sample contains an entity present in such an amount to cause FSD, preferably FSAD, or is in an amount so as to cause FSD, preferably FSAD; wherein the entity has a direct or indirect effect on the level or activity of cAMP in the sexual genitalia of the female.

19. A diagnostic composition or kit comprising means for detecting an entity in an isolated female sample; wherein the means can be used to determine whether the sample contains the entity and in such an amount to cause FSD, preferably FSAD, or is in an amount so as to cause FSD, preferably FSAD; wherein the entity has a direct or indirect effect on the level or activity of cAMP in the sexual genitalia of the female.

20. An animal model used to identify agents capable of treating FSD, preferably FSAD, said model comprising an anaesthetised female animal including means to measure changes in vaginal blood flow of said animal following stimulation of the pelvic nerve thereof.

21. An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, preferably FSAD, the assay method comprising: administering an agent to the animal model of claim 20; and measuring any potentiation of cAMP and/or increase in blood flow in the vagina of said animal.

22. An agent identified by the assay method according to claim 21.

23. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD (preferably FSAD); the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

24. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD (preferably FSAD); and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

25. A method of treating a female suffering from FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; wherein the agent is optionally

admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

26. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing vaginal blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

27. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing vaginal blood flow; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

28. A method of treating a female for FSD (preferably FSAD) or to prevent FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

29. The invention according to any one of claims 23 to 28 wherein said agent potentiates cAMP.

30. The invention according to any one of the preceding claims wherein said cAMP is endogenous cAMP (as defined herein).

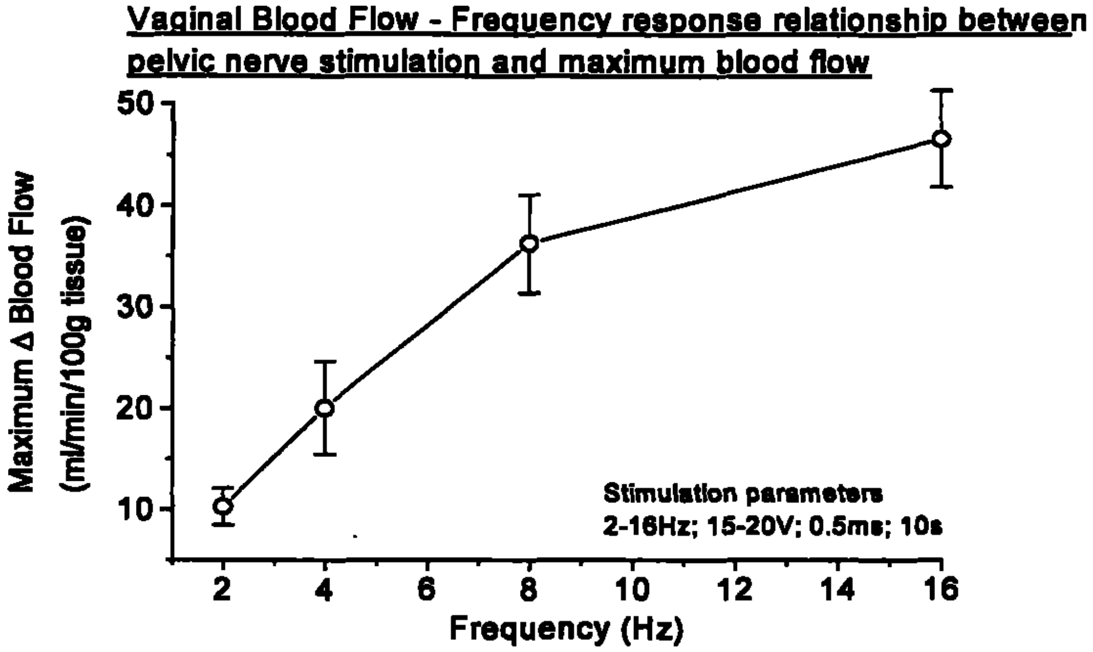
## ABSTRACT

## PHARMACEUTICAL

A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD, is described. The method comprises delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female. The agent may be admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

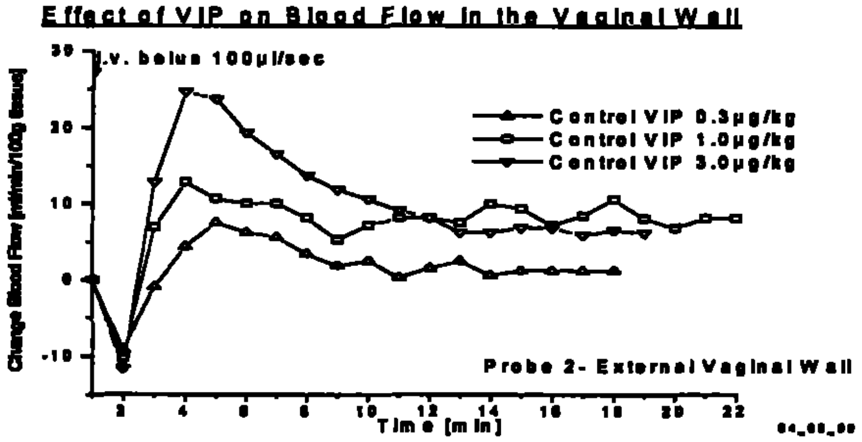
1115

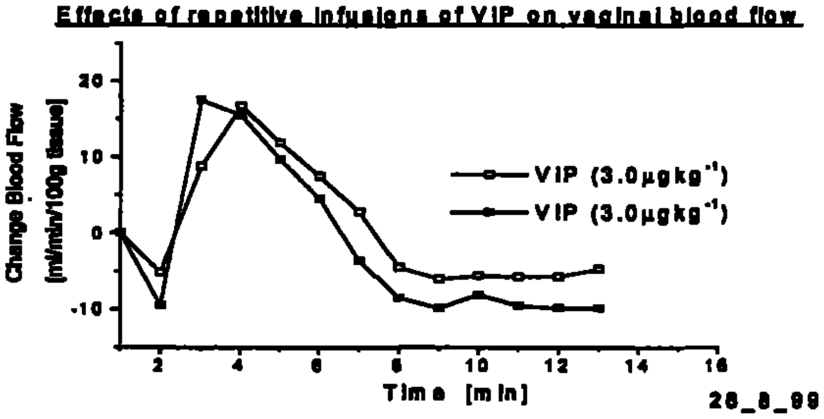
Figure 1



1116 #6

Figure 2

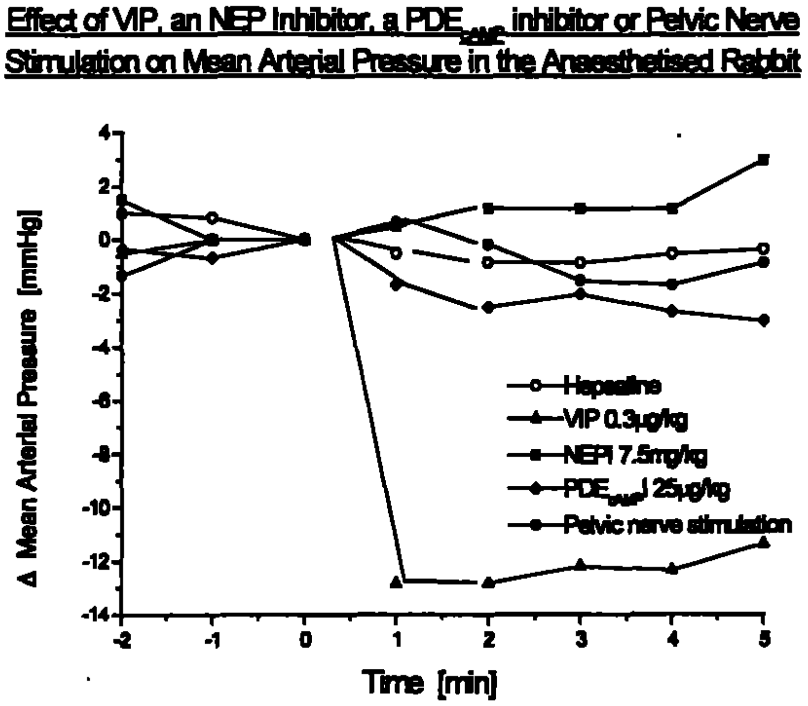




2/10

1117

Figure 3



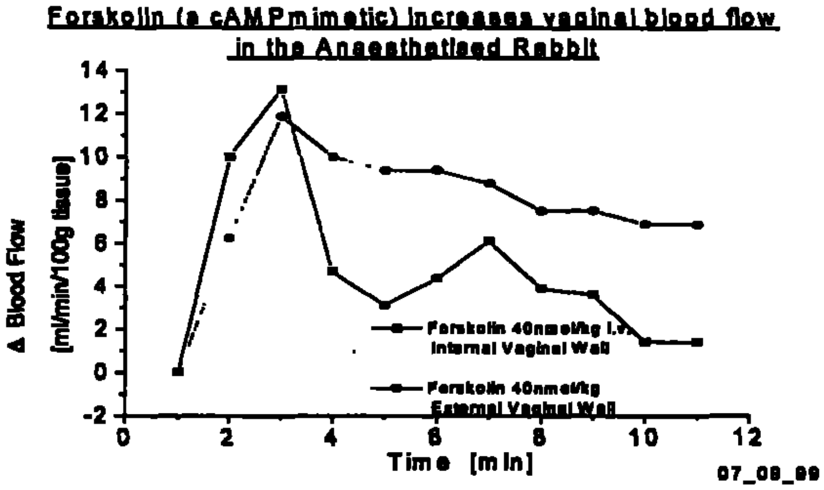
22_10_99

3/10

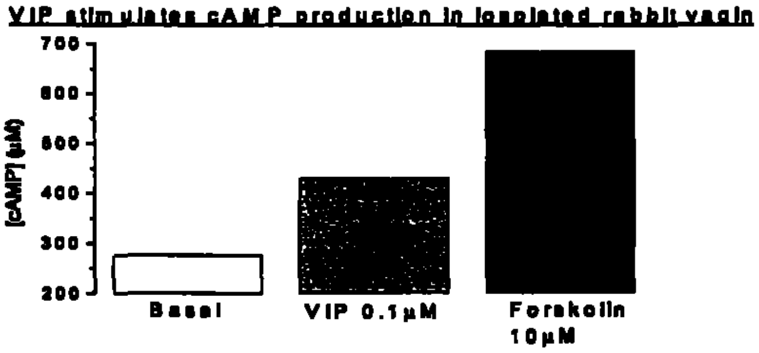
1118

Figure 4

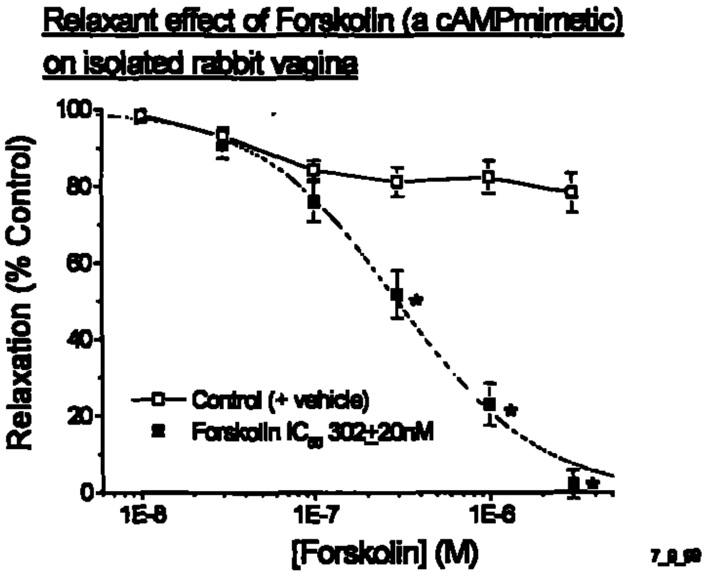
4a



)



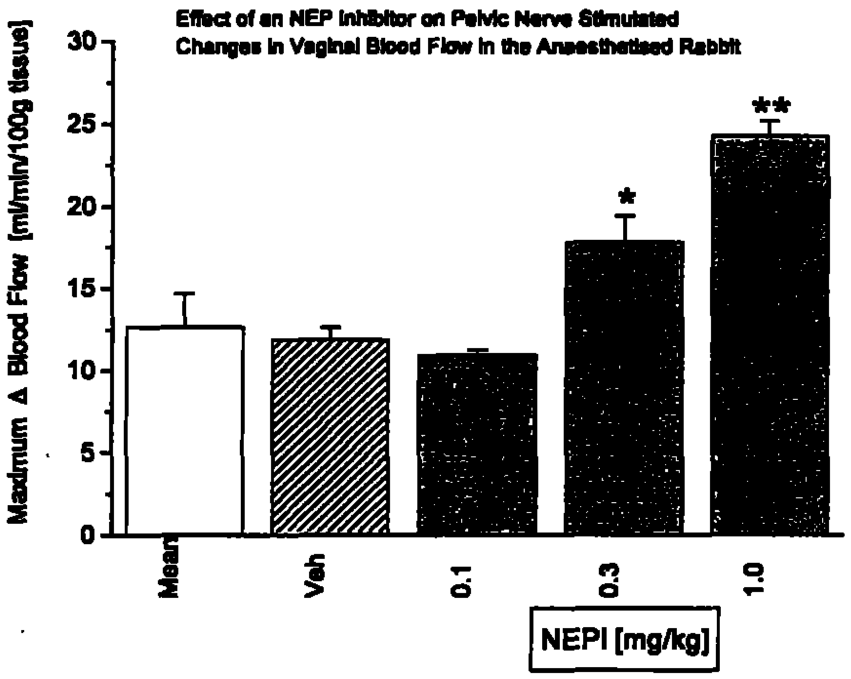
4b)



4c)

4/10

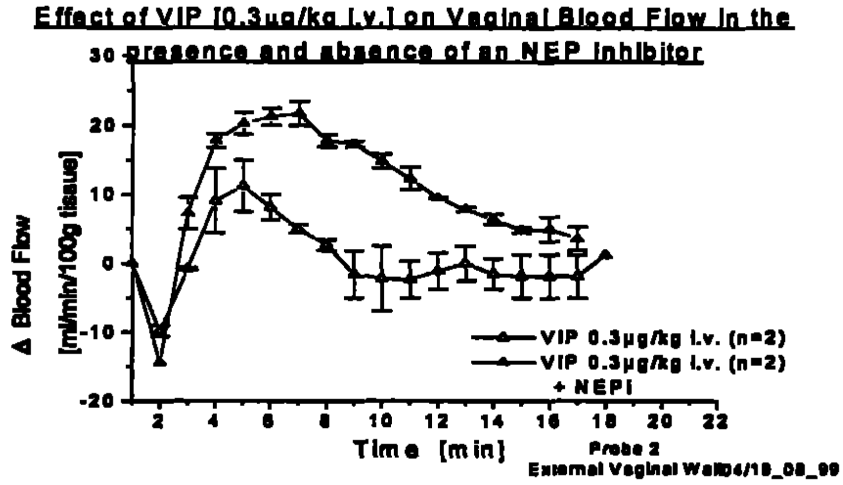
Figure 5

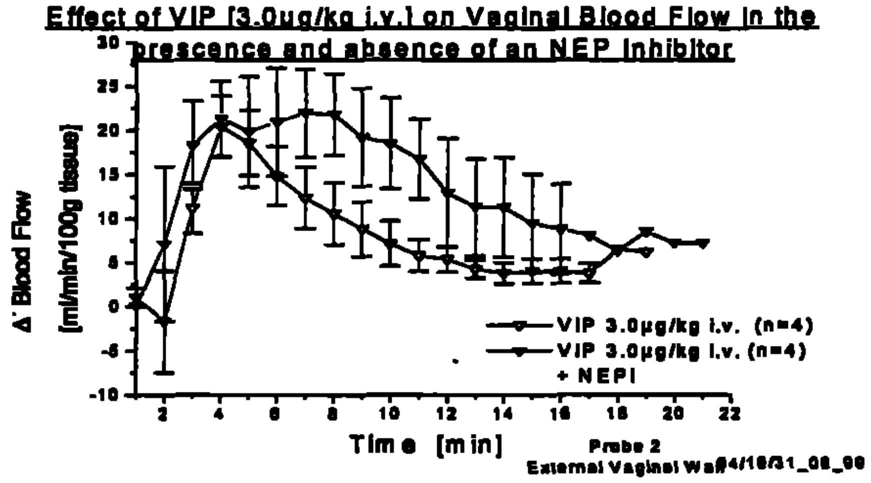

Effect of an NEP Inhibitor on Pelvic Nerve Stimulated Changes in Vaginal Blood Flow in the Anaesthetised Rabbit
Maximum Δ Blood Flow [ml/min/100g tissue]
30
25
20
15
10
5
0
*
**
Mean
Veh
0.1
0.3
1.0
NEPI [mg/kg]

5/10

1120

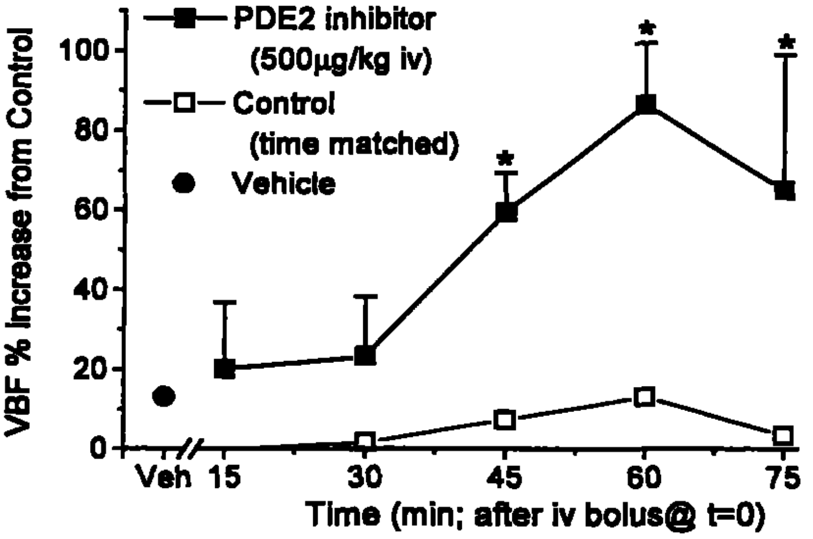
Figure 6





6/10

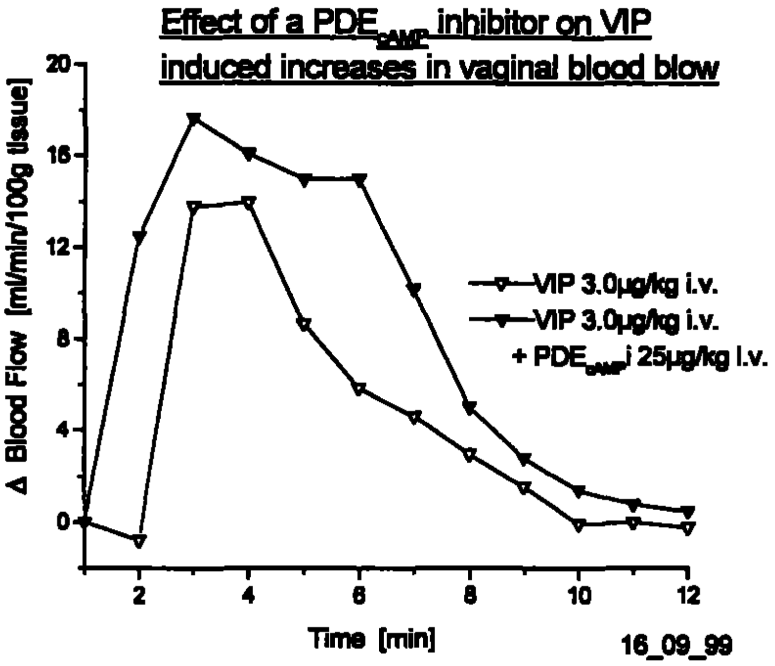
Figure 7



* P>0.01 Student's paired t-test

1122 #22

Figure 8



8|10

**Figure 9**

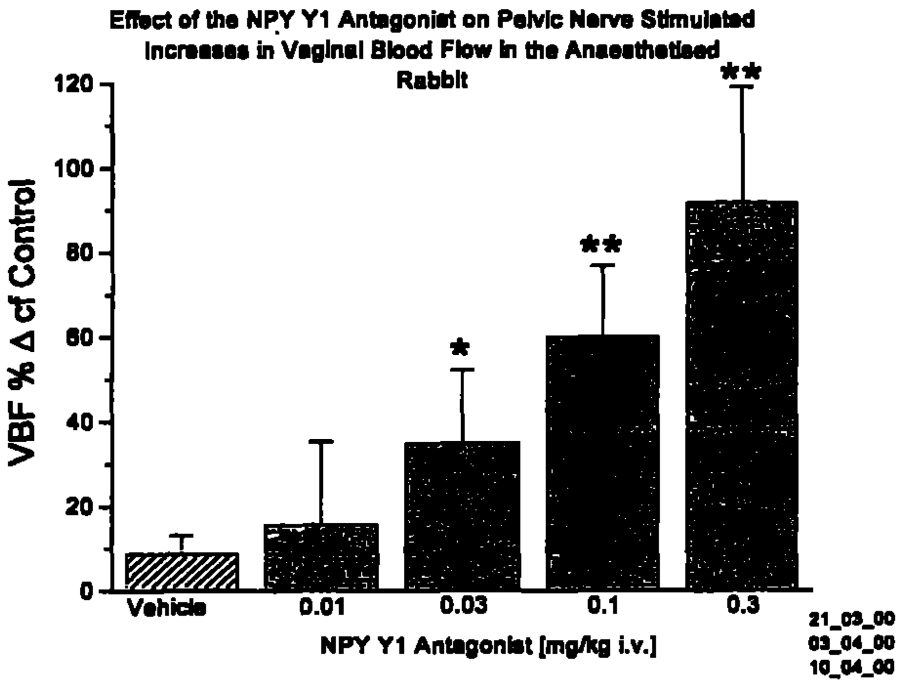
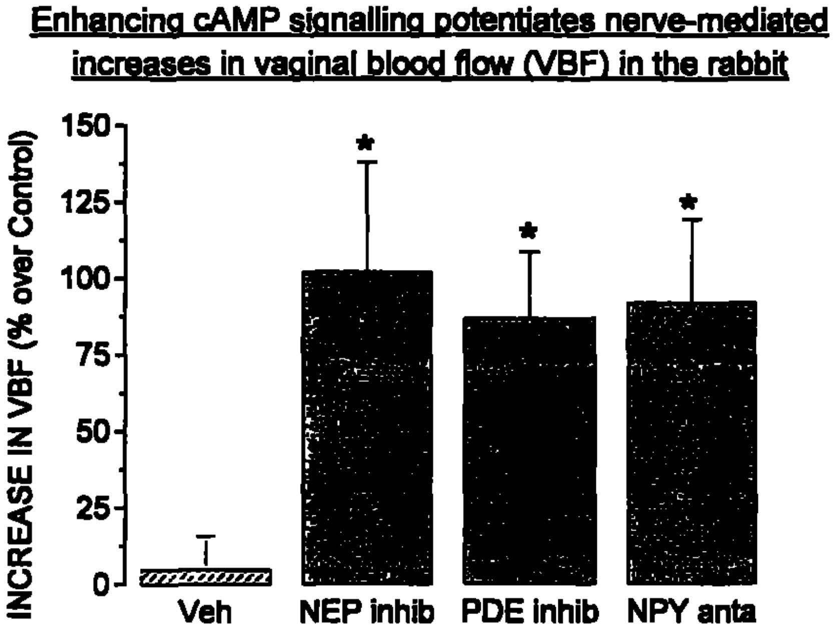

Effect of the NPY Y1 Antagonist on Pelvic Nerve Stimulated Increases in Vaginal Blood Flow in the Anaesthetised Rabbit
VBF % Δ of Control
0
20
40
60
80
100
120
*
**
**
Vehicle
0.01
0.03
0.1
0.3
NPY Y1 Antagonist [mg/kg i.v.]
21_03_00
03_04_00
10_04_00

Figure 10


Enhancing cAMP signalling potentiates nerve-mediated increases in vaginal blood flow (VBF) in the rabbit
INCREASE IN VBF (% over Control)
150
125
100
75
50
25
0
*
*
*
Veh
NEP inhib
PDE inhib
NPY anta

[illegible] MORENO
[illegible]
MADRID

1125

# OFICINA DE PATENTES

Oficina de Patentes
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

El abajo firmante, siendo funcionario debidamente autorizado de acuerdo con la Sección 74(1) y (4) de la Ley de 1994 de Regulación y Contratación exterior, para firmar y expedir certificados por cuenta del Interventor General, certificó que, adjunto al presente documento se encuentra una copia exacta de los documentos presentados originalmente con relación a la solicitud de Patente identificada aquí.

Si, de acuerdo con las Normas de Patentes de 1.982 (Re-registro de Compañías) una compañía nombrada en el presente certificado y en cualesquiera documentos que lo acompañan ha sido re-registrada al amparo de la Ley de Sociedades de 1.980 con el mismo nombre con el cual había sido registrada inmediatamente antes de su re-registro salvo la sustitución, o la inclusión, como última parte del nombre, de las palabras "sociedad de responsabilidad limitada" o sus equivalentes en Galés, las referencias al nombre de la compañía en este certificado y en cualesquiera documentos que le acompañan deberán ser tratados como referencias al nombre con el cual esté re-registrada.

De acuerdo con las reglas, las palabras "sociedad a responsabilidad limitada" pueden ser sustituidas por p.l.c., plc. P.L.C. o PLC.

El re-registro bajo la Ley de Sociedades no constituye una nueva entidad legal sino que somete simplemente la sociedad a ciertas normas adicionales de la Ley de sociedades.

Firmado: Ilegible

Fecha: 2 agosto 2000

Agencia Ejecutiva del Ministerio de Comercio e Industria

MORENO

IMPRESO 1/77
Ley de Patentes 1977
(Regla 16)

177 1126

## OFICINA DE PATENTES

**Solicitud de concesión de una patente**
**(ver las notas por detrás de este impreso.**
**También puede conseguir un folleto explicatorio**
**de la Oficina de Patentes para rellenar este impreso)**

**Oficina de Patentes**
**Cardiff Road**
**Newport**
**Gwent NP9 1RH**

---

1. Su referencia P009326GB CTH

---

2. Solicitud de patente número 0016563.9 05 JUL 2000
(La Oficina de Patentes rellenará este apartado)

---

3. Nombre completo, dirección y código postal del solicitante o solicitantes (subrayar los apellidos)

Pfizer Limited
Ramsgate Road
Sandwich
Kent
CT13 9NJ

Número de ADP (si se conoce) 1271001

Si el solicitante el una empresa, indicar el país/estado de su incorporación REINO UNIDO

---

4. Título de la invención PRODUCTO FARMACÉUTICO

---

5. Nombre de su agente (si lo tiene)

"Dirección" en el Reino Unido donde debería enviarse toda la correspondencia. (incluyendo el códico postal)

D. YOUNG & CO
21 NEW FETTER LANE
LONDON
EC4A 1DA

Número de ADP (si lo conoce) 59006

---

6. Si va a declarar prioridad por una o más solicitudes de patentes anteriores, indice el país y la fecha de solicitud de cada una de las solicitudes anteriores (si lo conoce) y el número de solicitud de las mismas

| País | número de solicitud de prioridad (si lo conoce) | Fecha (día/mes/año) |
|---|---|---|
| 1° | | |
| 2° | | |
| 3° | | |

PATRICIA [illegible] MORENO

---

7. Si esta solicitud es una divisional o derivada de una solicitud británica anterior, indicar el número y fecha de la solicitud anterior

| Número de la solicitud anterior | Fecha de solicitud |
|---|---|
| | |

---

8. ¿Se requiere una declaración de inventor y de derecho de concesión de una patente para mantener esta petición? (responder si en caso: SI
   - a) algún solicitante nombrado en el apartado 3 no es un inventor, o
   - b) hay un inventor quien es nombrado como un solicitante, o
   - c) algún solicitante nombrado es una empresa

   Ver nota (d)

---

9. Poner el número de páginas para cada uno de los siguientes requisitos que está solicitando en este impreso.
   No contar copias del mismo documento

| | |
|---|---|
| Hojas de continuación de este impreso | 0 |
| Descripción | 184 |
| Reivindicaciones | 5 |
| Resumen | 1 |
| Dibujos | 1 + 1 |

---

10. Si también está solicitando alguna de las siguientes, declare cuantos de cada requisito.

| | |
|---|---|
| Documentos de Prioridad | 0 |
| Traducción de los Documentos de Prioridad | 0 |
| Declaración de los inventores y derecho de concesión de una patente (impreso de patente 1/77) | 0 |
| Solicitud de examen preliminar y búsqueda (impreso de patente 1/77) | 0 |
| Solicitud de examen substantivo (impreso de patente 1/77) | 0 |
| Otros documentos (especificar) | 0 |

---

11. Solicitamos la concesión de una patente basada ne esta solicitud
Firma __Ilegible__ Fecha 6 de julio 2000
D YOUNG & CO
Agentes de los solicitantes

MORENO
AN
MADRID
Telf.

1126

12. Nombre y número de teléfono de la persona de contacto en el Reino Unido    Charles Harding 023 80634816

**Advertencia**

Despues de haber sido presentada una solicitud de Patente, el Interventor de la Oficina de Patentes estudiará si la publicación o la comunicación de la invención ha de ser prohibida o restringida de acuerdo con la Sección 22 de la Ley de Patentes de 1.997, y dará a conocer al solicitante si esta prohibición o esta restricción es necesaria. Se recuerda igualmente a los solicitantes que residen en el Reino Unido que las solicitudes no pueden ser presentadas fuera del país sin autorización escrita a no ser que una solicitud haya sido presentada en un plazo no inferior a 6 semanas, anteriormente, en el Reino Unido para una patente relacionada con la misma invención y si no se les ha dado ninguna instrucción prohibiendo la publicación o la comunicación o la revocación de esta instrucción.

**Notas**

a) Si usted necesita ayuda para rellenar este impreso o tiene alguna pregunta, por favor póngase en contacto con la Oficina de Patentes en 0645 500505
b) Sírvanse escribir a máquina, o con tinta negra utilizando letras mayúsculas. Una
c) Si no hay suficiente espacio para todos los detalles pertinentes en cualquier apartado de este impreso, por favor continúe en hoja aparte y escriba "ver hoja complementaria" en la parte(s) pertinente. Cualquier hoja complementaria debería adjuntarse a este impreso.
d) Si usted ha contestado "Si" necesitará rellenar el impreso de patente 7/77.
f) Para los detalles de la tasa y forma de pago, sírvanse consultar la Oficina de Patentes

**Impreso de Patentes 1/77**

[illegible] MORENO
[illegible] ADRID

GB 0016563.9 solicitada el 5 de julio de 2000

# PRODUCTO FARMACEUTICO

## AMBITO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un producto farmacéutico que es útil para el tratamiento de la disfunción sexual femenina (FSD), en particular de trastornos de la excitación sexual femenina (FSAD).

La presente invención se refiere también a un procedimiento de tratamiento de la FSD, en particular de los FSAD.

La presente invención se refiere también a ensayos para rastrear compuestos útiles en el tratamiento de la FSD, en particular de los FSAD.

Por conveniencia, se presenta una lista de las abreviaturas que se utilizan en el siguiente texto antes de la sección de reivindicaciones.

## RESPUESTA SEXUAL FEMENINA

La fase de excitación de la respuesta sexual femenina no se distingue fácilmente de la fase de deseo hasta que empiezan a tener lugar cambios fisiológicos en la vagina y clítoris así como en otros órganos sexuales. La excitación y placer sexuales están acompañados de una

[illegible] MORENO
[illegible] Y ALEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

combinación de eventos vasculares y neuromusculares que conducen a la congestión del clítoris, labios y pared vaginal, a un aumento de la lubricación vaginal y de la dilatación del lumen vaginal (Levin, 1980, Ottesen, 1983, Levin, 1991, Levin, 1992, Sjoberg, 1992, Wagner, 1992, Schiavi et al., 1995, Masters et al., 1996, Berman et al., 1999).

La congestión vaginal posibilita que tenga lugar la trasudación, y este proceso es responsable del aumento de la lubricación vaginal. La trasudación permite un flujo de plasma a través del epitelio sobre la superficie de la vagina, cuya fuerza motriz es el aumento del flujo sanguíneo en el lecho capilar vaginal durante el estado excitado. Además, la congestión conduce a un aumento de la longitud vaginal y del diámetro luminal, especialmente en los dos tercios distales del canal vaginal. La dilatación luminal de la vagina se debe a una combinación de la relajación del músculo liso de esta pared y la relajación del músculo esquelético de los músculos del suelo pélvico. Algunos trastornos de dolor sexual, como el vaginismo, se piensa que son debidos, al menos en parte, a una inadecuada relajación que evita la dilatación de la vagina, todavía debe determinarse si este es un problema principalmente del músculo liso o del esquelético. (Levin, 1980, Ottesen,

PATRICIA KOCH MORENO
ALEMAN
113
MADRID

1983, Levin, 1991, Sjoberg, 1992, Wagner, 1992, Schiavi et al., 1995, Master et al., 1996, Berman et al., 1999).

La vasculatura y microvasculatura de la vagina están inervadas por nervios que contienen neuropéptidos y otros candidatos a neurotransmisores. Estos incluyen el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), el neuropéptido Y (NPY), la óxido nítrico sintasa (NOS), la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), (Hoyle et al., 1996). Los péptidos que están presentes en el clítoris se discuten a continuación. La óxido nítrico sintasa, que se localiza a menudo con el VIP, muestra una mayor expresión, inmunológicamente, en las arterias y venas profundas que en los vasos sanguíneos propios (Hoyle et al., 1996).

## DISFUNCION SEXUAL FEMENINA

Se sabe que algunos individuos pueden sufrir disfunción sexual femenina (FSD).

La FSD se define como la dificultad o incapacidad de una mujer para encontrar satisfación en la expresión sexual. La FSD es un término colectivo para varios trastornos sexuales femeninos (Leiblum, 1998, Berman et al., 1999). La mujer puede tener falta de deseo, dificultad con la

PATRICIA MARS MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. ... 113
... MADRID
Telf. ...

excitación o el orgasmo, dolor en el coito o una combinación de estos problemas. Algunos tipos de enfermedades, medicaciones, heridas o problemas psicológicos pueden producir la FSD.

Los estudios que investigan la disfunción sexual en parejas revelan que hasta el 76% de las mujeres padecen la disfunción sexual y que el 30-50% de las mujeres de los EE.UU. experimentan la FSD.

Los subtipos de FSD incluyen trastorno del deseo sexual hipoactivo, trastorno en la excitación sexual femenina, trastornos del orgasmo y trastorno del deseo sexual.

Los tratamientos en desarrollo están dirigidos a tratar subtipos específicos de FSD, predominantemente los trastornos del deseo y de la excitación.

Las categorías de la FSD se definen mejor por contraste con las fases de la respuesta sexual femenina normal: deseo, excitación y orgasmo (Leiblum, 1998). El deseo o líbido es el motor de la expresión sexual, y sus manifestaciones incluyen a menudo pensamientos sexuales junto con un compañero interesado o al exponerse a otros estímulos sexuales. En contraposición, la excitación sexual es la

[illegible] MORENO
[illegible] ALEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID

respuesta vascular a la estimulación sexual, un componente importante de la cual es la lubricación vaginal y la elongación de la vagina. De esta manera, la excitación sexual, en contraposición con el deseo sexual, es una respuesta relativa al flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal y clitorídeo) y no necesariamente sensibilidad. El orgasmo es la liberación de la tensión sexual que ha culminado durante la excitación.

Por ello, la FSD aparece típicamente cuando una mujer tiene una respuesta inadecuada o insatisfactoria en cualquiera de estas fases, habitualmente deseo, excitación u orgasmo. Las categorías de la FSD incluyen: trastorno del deseo sexual hipoactivo, trastorno de la excitación sexual, trastornos orgásmicos y trastornos de dolor sexual.

El trastorno del deseo sexual hipoactivo está presente si una mujer no tiene deseo, o tiene poco, de ser sexual, y no tiene pensamientos o fantasías sexuales, o tiene pocos. Este tipo de la FSD puede producirse por niveles bajos de testosterona, debidos a la menopausia natural o a la menopausia quirúrgica. Otras causas incluyen enfermedad, medicaciones, fatiga, depresión y ansiedad.

El trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) se

MORENO
INGLES Y ALEMAN
ADRID

caracteriza por una respuesta genital inadecuada a la estimulación sexual. Los genitales (por ejemplo la vagina y/o el clítoris) no experimentan la congestión que caracteriza a la excitación sexual normal. Las paredes vaginales están poco lubricadas, de modo que el coito es doloroso. Los orgasmos pueden estar imposibilitados. El trastorno de la excitación puede estar producido por una reducción de estrógenos en la menopausia o después de un parto y durante la lactancia, así como por enfermedad, con componentes vasculares como diabetes y aterosclerosis. Otras causas son resultado del tratamiento con agentes diuréticos, antihistamínicos, antidepresivos, por ejemplo SSRI, o antihipertensivos. Se discute el FSAD con más detalle a continuación.

Los trastornos de dolor sexual (que incluyen dispareunia y vaginismo) se caracterizan por dolor como resultado de la penetración y pueden estar causados por medicaciones que reducen la lubricación, endometriosis, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad intestinal inflamatoria o problemas del tracto urinario.

La prevalencia de la FSD es difícil de calibrar debido a que el término cubre varios tipos de problemas, algunos de los cuales son difíciles de medir, y debido a que el

[illegible] MORENO
[illegible] Y [illegible]
[illegible] 113
MADRID

interés por tratar la FSD es relativamente reciente. Muchos problemas sexuales de las mujeres están asociados directamente al proceso de envejecimiento femenino o a enfermedades crónicas como diabetes e hipertensión.

Existen amplias variaciones en la incidencia y prevalencia de la FSD descritas, explicadas en parte por el uso de criterios de evaluación diferentes, pero la mayoría de los investigadores comunica que una proporción significativa de mujeres por lo demás sanas tiene síntomas de uno o más de los subgrupos FSD. Como ejemplo, los estudios que comparan la disfunción sexual en parejas revelan que el 63% de las mujeres tienen disfunción de la excitación o del orgasmo, comparado con el 40% de los hombres que tienen disfunción eréctil o eyaculatoria (Frank et al., 1978).

Sin embargo, la prevalencia del trastorno de la excitación sexual femenina varía considerablemente de estudio a estudio. En un reciente estudio de National Health and Social Life, el 19% de las mujeres comunicaron dificultades de lubricación, mientras que el 14% de las mujeres pacientes ambulatorias de una clínica ginecológica comunicaron dificultades similares con la lubricación (Rosen et al., 1993).

MORENO
ALEMAN
113
MADRID
Teléf.

Varios estudios han informado también acerca de disfunción de la excitación sexual en mujeres diabéticas (hasta un 47%), incluyendo la reducción de la lubricación vaginal (Wincze et al., 1993). No hubo asociación entre neuropatía y disfunción sexual.

Numerosos estudios han mostrado también que entre un 11-48% de mujeres en conjunto pueden tener un deseo sexual reducido con la edad. De forma similar, entre 11-50% de las mujeres comunican problemas con la excitación y la lubricación, y por lo tanto experimentan dolor en el coito. El vaginismo es menos común, afectando aproximadamente al 1% de las mujeres.

Los estudios de mujeres sexualmente experimentadas han detallado que el 5-10% tienen anorgasmia primaria. Otro 10% tiene orgasmos infrecuentes y otro 10% los experimenta inconsistentemente (Spector et al., 1990).

Debido a que la FSD consiste en varios subtipos que expresan síntomas en fases separadas del ciclo de respuesta sexual, no hay una terapia única. El tratamiento actual de la FSD se enfoca principalmente a temas psicológicos y de relación. El tratamiento de la FSD evoluciona gradualmente según se dedican más estudios clínicos y de ciencia básica

[illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. [illegible], 113
Telef. [illegible] - MADRID

a la investigación de este problema médico. Las dolencias sexuales femeninas no son todas psicológicas en su patofisiología, especialmente para aquellos individuos que pueden tener un componente de disfunción vasculogénica (por ejemplo FSAD) que contribuye a la dolencia sexual femenina en conjunto. No existen actualmente fármacos autorizados para el tratamiento de la FSD. La terapia de medicamentos empírica incluye la administración de estrógenos (tópicamente o en forma de una terapia de sustitución hormonal), andrógenos o medicamentos de alteración del ánimo como buspirona o trazodona. Estas opciones de tratamiento a menudo son insatisfactorias debido a la baja eficacia o a efectos secundarios inaceptables.

Puesto que el interés en tratar la FSD farmacológicamente es relativamente reciente, la terapia consiste en los siguiente: consejo psicológico, lubricantes sexuales sin receta médica y candidatos investigacionales, incluyendo medicamentos aprobados para otras dolencias. Estos medicamentos consisten en agentes hormonales, testosterona o combinaciones de estrógeno y testosterona, y más recientemente, medicamentos vasculares que se han mostrado eficaces en la disfunción eréctil masculina. Ninguno de estos agentes ha demostrado ser muy eficaz para tratar la FSD.

## TRASTORNO DE LA EXCITACION SEXUAL FEMENINA (FSAD)

La respuesta de excitación sexual consiste en la vasocongestión de la pelvis, la lubricación vaginal y la expansión y tumefacción de los genitales externos. Su alteración produce una notable tensión y/o dificultades interpersonales. Los estudios que han investigado la disfunción sexual en parejas revelan que existe un gran número de mujeres que sufren disfunción de la excitación sexual, conocida también como trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD).

El manual de diagnóstico y estadística (DSM) IV de la Asociación Psiquiátrica Americana define el trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) como:

> "*una incapacidad persistente o recurrente para alcanzar o mantener hasta la terminación de la actividad sexual una respuesta adecuada de lubricación-tumefacción de la excitación sexual. La alteración produce una notable tensión o dificultades interpersonales.*"

El FSAD es un trastorno sexual altamente prevalente que afecta a mujeres pre-, peri- y postmenopáusicas (±HRT).

Está asociado a trastornos concomitantes como depresión, enfermedades cardiovasculares, diabetes y trastornos UG.

Las consecuencias primarias del FSAD son la falta de congestión/tumefacción, falta de lubricación y falta de sensación genital placentera. Las consecuencias secundarias del FSAD son una reducción del deseo sexual, dolor durante el coito y dificultades para conseguir un orgasmo.

Recientemente se ha hipotetizado que existe una base vascular para al menos una parte de las pacientes con síntomas del FSAD (Goldstein et al., 1998) con datos animales que apoyan esta perspectiva (Park et al., 1997).

Los medicamentos candidatos para el tratamiento del FSAD, en los que se está investigando su eficacia, son principalmente terapias de disfunción eréctil que potencian la circulación en los genitales masculinos. Consisten en dos tipos de formulación: medicación oral o sublingual (apomorfina, fentolamina, sildenafilo) y prostaglandina ($PGE_1$-alprostadil) que se inyecta o administra transuretralmente en hombres, y tópicamente en los genitales de las mujeres.

La presente invención trata de proporcionar un medio eficaz

[illegible] MADRID

de tratamiento de la FSD, en particular de los FSAD.

ASPECTOS DEL SUMARIO DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se basa en los descubrimientos según los cuales el FSAD está asociado a una reducción del flujo sanguíneo genital, en particular una reducción del flujo sanguíneo genital en la vagina y el clítoris. Por ello, el tratamiento de mujeres con FSAD puede llevarse a cabo por estimulación del flujo sanguíneo genital con agentes vasoactivos. En los estudios de los presentes autores se ha mostrado claramente que el cAMP media en la vasorrelajación vaginal y clitorídea y que el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal y clitorídeo) puede estimularse/potenciarse por elevación de los niveles de cAMP. Este es el descubrimiento base.

A este respecto, nadie ha propuesto anteriormente que el FSAD pueda tratarse de tal manera, es decir, por elevación directa o indirecta de los niveles de cAMP. Además, no hay explicaciones en la técnica que sugieran que el FSAD estaba asociado a una modulación perjudicial de la actividad y/o niveles de cAMP o que el cAMP es responsable de la mediación en la vasorrelajación vaginal y clitorídea. Por ello, la presente invención es sorprendente.

Además, se ha encontrado que utilizando los agentes de la presente invención es posible tratar el FSAD aumentando la congestión genital, por ejemplo lubricación aumentada de la vagina y sensibilidad aumentada de la vagina y el clítoris.

Por ello, en un aspecto amplio, la presente invención se refiere al uso de un potenciador de cAMP para tratar la FSD, en particular el FSAD.

La presente invención es ventajosa porque proporciona un medio para restablecer una respuesta de excitación sexal normal, es decir, un aumento del flujo sanguíneo genital que conduce a la congestión vaginal, clitorídeo y labial. Esto resultará en un aumento de la lubricación vaginal por trasudación de plasma, un aumento de la flexibilidad vaginal y un aumento de la sensibilidad genital (por ejemplo vaginal y clitorídea). Por ello, la presente invención proporciona un medio para restablecer, o imitar, la respuesta de excitación sexual normal.

## ASPECTOS DETALLADOS DE LA PRESENTE INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en

MORENO
ALEMAN
113
MADRID

el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una mujer que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En este caso, la composición (como cualquiera de las demás composiciones mencionadas en la presente) puede estar envasada para uso posterior en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, siendo capaz el agente de potenciar cAMP en los genitales de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la mujer, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o

[illegible] MADRID

excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP; siendo una potenciación del cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular de los FSAD.

Como ejemplo, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto un agente con un resto capaz de afectar a la actividad y/o niveles de cAMP, y medir la actividad y/o niveles de cAMP, siendo una potenciación del cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD.

Como otro ejemplo, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar

[illegible] 113 [illegible] MADRID

FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto un agente con cAMP, y medir la actividad de cAMP, siendo una potenciación del cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de: (a) realizar el ensayo según la presente invención, (b) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente la actividad de cAMP y (c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados.

En este aspecto, el agente identificado en la etapa (b) puede modificarse de modo que, por ejemplo, se maximice la actividad y después puede repetirse la etapa (a). Estas etapas pueden repetirse hasta que se alcance la actividad o perfil farmacocinético deseado.

Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de (a1) realizar el ensayo según la presente invención, (b1) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente la actividad de cAMP, (b2) modificar uno o más de los citados gentes identificados, (a2) repetir opcionalmente

PATRICIA [illegible]
INGLES Y [illegible]
[illegible] 115
MADRID

la etapa (a1) y (c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados (es decir, aquellos que se han modificado).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de la FSD, en particular FSAD, por potenciación in vivo de cAMP con un agente, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP en un procedimiento de ensayo in vitro, siendo el procedimiento de ensayo in vitro el procedimiento de ensayo según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP al ensayarlo in vitro mediante el procedimiento de ensayo según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un modelo animal utilizado para identificar agentes capaces de tratar FSD (en particular FSAD), comprendiendo el citado modelo un animal hembra anestesiado incluyendo los medios para medir cambios en el flujo sanguíneo vaginal del citado animal después de la estimulación del nervio pélvico de

113
MADRID

1146

éste.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar FSD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: administrar un agente al modelo animal de la presente invención y medir cualquier potenciación de cAMP y/o cualquier aumento del flujo sanguíneo en la vagina y/o clítoris del citado animal.

Para facilitar la referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se discuten ahora en los encabezados de sección apropiados. Sin embargo, las explicaciones de cada sección no están limitadas necesariamente a cada sección particular.

## ASPECTOS PREFERIDOS

Preferiblemente el agente es para el tratamiento de los FSAD.

Preferiblemente el agente es un mediador de la vasorrelajación genital (por ejemplo vaginal o clitorídea).

En una realización, el agente es preferiblemente para administración oral.

En otra realización, el agente puede ser preferiblemente para administración tópica.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un efecto potenciador sobre cAMP. Ejemplos de dichos agentes incluyen I:NEP y/o I:NPY. Expresado como alternativa, para algunas aplicaciones el agente no tiene preferiblemente un efecto potenciador directo sobre cAMP. Se comprende que el agente puede tener un efecto potenciador indirecto sobre cAMP actuando sobre agentes de actuación directa de origen y localización natural, como los VIP de origen y localización natural.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un efecto potenciador directo sobre cAMP. Ejemplos de dichos agentes incluyen I:PDE.

Para algunas aplicaciones el agente de la presente invención puede administrarse junto con otro agente farmacéuticamente activo. En ese caso la administración conjunta no tiene porqué hacerse a la vez, sino tan sólo por la misma ruta. Un ejemplo de composición de

113 MADRID

administración conjunta podría ser una composición que comprende un agente según la presente invención y un agente adicional, pudiendo tener el agente adicional un efecto potenciador directo sobre cAMP. Los ejemplos de combinación se discuten a continuación.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un inhibidor, es decir es capaz de exhibir una función inhibidora.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:PDE (a veces escrito como PDEi), más preferiblemente un I:PDEII (a veces escrito como I:PDE2 o I:PDEIIi o PDE2i).

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NEP (a veces escrito como NEPi).

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NPY (a veces escrito como NPYi).

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:PDEII selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NEP selectivo.

1149.

[illegible] 13
[illegible] MADRID

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NPY selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente preferiblemente no produce, o es administrado de forma que no lo produzca, una caída prolongada de la presión sanguínea (por ejemplo durante un periodo de aproximadamente 5 minutos o más). En esta realización, si el agente se administra tópicamente, entonces dicho agente puede tener la capacidad de producir una caída de la presión sanguínea (como si se suministrase por vía intravenosa), siempre que en la aplicación tópica pasen unos niveles mínimos de agente al torrente sanguíneo. Para un agente oral se prefiere que el agente no produzca una caída prolongada de la presión sanguínea.

En un aspecto preferido el agente no produce, o es administrado de forma que no produzca, un gran cambio en el ritmo cardiaco.

## TRATAMIENTO

Se apreciará que todas las referencias al tratamiento en la presente incluyen uno o más de: tratamiento curativo, paliativo o profiláctico. Preferiblemente el término tratamiento incluye al menos tratamiento curativo y/o tratamiento paliativo.

GENITALES FEMENINOS

El término "genitales femeninos" se utiliza según la definición proporcionada en Anatomy de Gray, C.D. Clemente, 13ª edición americana, a saber:

> *"Los órganos genitales consisten en un grupo interno y otro externo. Los órganos internos están situados en la pelvis y consisten en ovarios, conductos uterinos, útero y vagina. Los órganos externos son superficiales respecto al diafragma urogenital y por debajo del arco pélvico. Comprenden el monte de Venus, los labios mayores y menores, el clítoris, el vestíbulo, el bulbo del vestíbulo y las glándulas vestibulares mayores."*

cAMP ENDOGENO

En una realización altamente preferida, el agente de la presente invención potencia el cAMP endógeno, de modo que potencia los niveles de cAMP endógeno.

En este caso, el término "cAMP endógeno" significa cAMP que

PAT. IND. [illegible] MORENO
ING. [illegible] 113
Telf. [illegible] - MADRID

se origina por la estimulación sexual (excitación sexual). Por ello, el término no comprende los niveles de cAMP que sean elevados independientemente del impulso sexual.

De esta manera, según la presente invención, se consigue el tratamiento de FSAD por potenciación directa o indirecta de la señalización de cAMP endógeno lo que, a su vez, aumenta el flujo sanguíneo/lubricación vaginal y/o el flujo sanguíneo clitorídeo, potenciando así la respuesta excitatoria sexual natural. De esta manera, el procedimiento de tratamiento de la presente invención restablece o potencia la respuesta excitatoria normal. En el procedimiento de tratamiento de la presente invención puede conseguirse este resultado mediante el uso de un inhibidor de NEP (EC 3.4.24.11) o un inhibidor de PDE hidrolizante de cAMP o un antagonista del receptor de NPY.

Se proporciona un modelo de ensayo animal en la presente. Este modelo de ensayo animal puede utilizarse para determinar aumentos del flujo sanguíneo genital como resultado de la potenciación de cAMP. En este modelo animal se estimula un nervio pélvico, que produce un efecto que imita la fisiología de una respuesta/excitación sexual. En estos experimentos, los agentes según la invención producen un aumento del flujo sanguíneo por encima de los aumentos

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
[illegible] RID

1152

de control, después de haber estimulado el nervio. En ausencia de estimulación, los agentes no tiene efecto (o es despreciable) en la producción de un aumento del flujo sanguíneo. Típicamente, en estos experimentos se estimula el nervio para obtener un aumento de la línea base del flujo sanguíneo. Después se suministra un agente candidato (o real) al animal sistémica o localmente, tal como por vía intravenosa, tópica u oral. Un aumento del flujo sanguíneo, comparado con los aumentos de control, es indicativo entonces de un agente según la presente invención.

## ESTIMULACION SEXUAL

La presente invención comprende también la administración del agente de la presente invención antes y/o durante la estimulación sexual. En este caso el término "estimulación sexual" puede ser sinónimo del término "excitación sexual". Este aspecto de la presente invención es ventajoso porque proporciona selectividad sistémica. La cascada natural aparece sólo en los genitales y no en otras localizaciones, por ejemplo en el corazón, etc. Por ello sería posible conseguir un efecto selectivo sobre los genitales.

De esta manera, para algunos aspectos de la presente invención es altamente deseable que exista una etapa de

PATRICIA MORENO

1153

estimulación sexual. Se ha encontrado que esta etapa puede proporcionar selectividad sistémica. En este caso, "estimulación sexual" puede ser una o más de: estimulación visual, estimulación física, estimulación auditiva o estimulación de pensamiento.

De esta manera, los agentes de la presente invención se suministran antes o durante la estimulación sexual, particularmente cuando dichos agentes son de administración oral.

Por ello, para este aspecto preferido, la presente invención proporciona el uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado medicamento.

Preferiblemente, la presente invención proporciona el uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSAF, siendo el agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado medicamento y siendo

[illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]AN
c [illegible], 113
Telf. [illegible] - MADRID

suministrado el citado medicamento oralmente a la citada hembra.

Además, para este aspecto preferido, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado agente.

Preferiblemente la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado agente, y

[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] - MADRID

siendo suministrado el citado agente oralmente a la citada hembra.

## POTENCIACION de cAMP

Como se utiliza en la presente con referencia al cAMP, el término "potenciación" incluye cualquiera de: aumento de la eficacia de cAMP, aumento de los niveles de cAMP, aumento de la actividad de cAMP, reducción del nivel de la degradación de cAMP, reducción del nivel de inhibición de cAMP.

El efecto potenciador puede ser un efecto directo. Un ejemplo de efecto directo sería la sobrerregulación de los niveles de cAMP por un agente que aumenta la expresión de éste.

Como alternativa, el efecto potenciador podría ser un efecto indirecto. Un ejemplo de dicho efecto sería la acción sobre una sustancia que, de otra manera, inhibiría y/o reduciría los niveles y/o actividad de cAMP. Otro ejemplo de dicho efecto sería el aumento de la acción de una sustancia que aumenta la eficacia de cAMP, aumenta los niveles de cAMP, aumenta la actividad de CAMP, reduce el nivel de degradación de cAMP o reduce el nivel de

MORENO
ALEMAN
113
MADRID
Teléf.

inhibición de cAMP.

Un ejemplo de PcAMP sería un I:PDE, tal como I:PDEII.

Miméticos de cAMP

Para algunos aspectos de la presente invención el agente puede actuar como un mimético de cAMP.

Como se utiliza en la presente, el término "mimético de cAMP" significa un agente que puede actuar de modo similar (por ejemplo tener un perfil y efecto biológico similares) al cAMP en los genitales sexuales femeninos, y hacerlo mediante uno o más de: aumento de la eficacia de los restos similares a cAMP, aumento de los niveles de los restos similares a cAMP, aumento de la actividad de los restos similares a cAMP, reducción del nivel de degradación de los restos similares a cAMP, reducción del nivel de inhibición de los restos similares a cAMP.

De esta manera, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso consiguiente en el tratamiento de los FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra

PATRICIA KOCH MORENO
ING. S Y ALEMAN
113
ADRID

que sufre FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

De esta manera, en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de los FSAD, siendo el agente capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

De esta manera, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente en una cantidad que potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un ejemplo de mimético de cAMP sería la forscolina. Hemos encontrado que la forscolina aumenta el flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo y puede actuar también como relajante vaginal.

PATRICIA ... MORENO
ING... ...AN
C ... 113
Telf ... MADRID

1158

En un aspecto preferido, el mimético de cAMP se administra oralmente.

## ACTIVADOR DE cAMP

Como se utiliza en la presente, el término "activador de cAMP" significa una sustancia que controla o libera cAMP en los genitales sexuales femeninos. El control puede ser directo (por ejemplo por sobre el cAMP mismo) o indirecto (por ejemplo a través de la activación de cAMP). Para facilitar la referencia se hace referencia a estas sustancias como $A_{cAMP}$.

## DIANA

El término "diana" como se utiliza en la presente con referencia a la presente invención significa cualquier sustancia que sea cAMP, un $A_{cAMP}$, un $I_{cAMP}$ o un $AM_{cAMP}$. Expresado de otra manera, la diana puede referirse como una diana $P_{cAMP}$.

La diana del agente de la presente invención puede ser una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos que codifica la misma y/o una unidad de expresión responsable de la expresión de la misma y/o un modulador

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] ALEMAN
[illegible] 13
[illegible]RID

de la misma.

La diana puede ser incluso una combinación de dichas dianas.

AGENTE

El agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como una $P_{cAMP}$.

El agente puede ser una secuencia de aminoácidos o un derivado químico de ésta. La sustancia puede ser incluso un compuesto orgánico u otro compuesto químico. El agente puede incluso ser una secuencia de nucleótidos, que puede ser una secuencia con sentido o una secuencia sin sentido. El agente puede ser incluso un anticuerpo.

De esta manera, el término "agente" incluye, pero no está limitado a ellos, un compuesto que puede obtenerse o producirse mediante cualquier fuente adecuada, natural o no.

El agente puede diseñarse u obtenerse a partir de una biblioteca de compuestos que puede comprender péptidos, así como de otros componentes como moléculas orgánicas

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
C [illegible] 113
[illegible] - MADRID

1160

pequeñas, tales como compuestos líder.

Como ejemplo, el agente puede ser una sustancia natural, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos como células o tejidos de bacterias, hongos, o animales (particularmente mamíferos), una molécula orgánica o inorgánica, un agente sintético, un agente semisintético, un mimético estructural o funcional, un péptido, un mimético de péptido, un agente derivado, un péptido cortado a partir de una proteína entera, o un péptido sintetizado sintéticamente (como, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos o por técnicas recombinantes o combinaciones de éstos), un agente recombinante, un anticuerpo, un agente natural o no natural, una proteína de fusión o equivalente de ésta y mutantes, derivados o combinaciones de éstos.

Como se utiliza en la presente, el término "agente" puede ser una entidad simple o puede ser una combinación de agentes.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, tal como cuando el agente es un I:NEP, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente un grupo amida (es decir N(H)-C(O)- o incluso -C(O)-N(H)-)

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] LEHMAN
C. [illegible] 113
Telf. [illegible] - MADRID

1161

y uno o más grupos hidrocarburo. En este caso, el término "grupo hidrocarburo" significa un grupo que comprende al menos C y H y puede comprender opcionalmente uno o más sustituyentes adecuados. Ejemplos de dichos sustituyentes pueden incluir halo, alcoxi, nitro, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes pueden formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarburo comprende más de un C, estos carbonos no tienen porque estar unidos necesariamente unos a otros. Por ejemplo, al menos dos de los carbonos pueden estar unidos a través de un elemento o grupo adecuado. De esta manera, el grupo hidrocarburo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente un grupo cíclico. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente un grupo cíclico unido a otro grupo hidrocarburo por medio de un enlace amida. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, tal como cuando el agente es un I:PDE, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente

PATRICIA KOEH. MORENO
INGLES Y ALEMAN
113
MADRID

dos o más grupos hidrocarburo unidos. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente al menos dos grupos cíclicos, siendo opcionalmente uno de dichos grupos cíclicos una estructura de anillo cíclico condensado. Para algunas aplicaciones, al menos uno de los grupos cíclicos es preferiblemente un grupo heterocíclico. Para algunas aplicaciones, el grupo heterocíclico comprende preferiblemente al menos un N en el anillo. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, como si el agente es un I:NPY, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente dos o más grupos hidrocarburo unidos. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente al menos dos grupos cíclicos, siendo uno de dichos grupos cíclicos una estructura de anillo cíclico condensado. Para algunas aplicaciones, al menos uno de los grupos cíclicos es preferiblemente un grupo heterocíclico. Para algunas aplicaciones, el grupo heterocíclico comprende preferiblemente al menos un N en el anillo. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

PATRICIA KOCH MORENO
INGLÉS Y ALEMAN
113
MADRID

El agente puede contener grupos halo. En este caso, "halo" significa fluoro, cloro, bromo o yodo.

El agente puede contener uno o más grupos alquilo, alcoxi, alquenilo, alquileno o alquenileno, que pueden ser de cadena lineal o ramificada.

El agente puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, como una sal de adición de ácidos o una sal básica o un solvato de éstas, incluyendo un hidrato de éstas. Para una revisión de las sales adecuadas véase Berge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19.

Las sales de adición de ácidos adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas y son ejemplos las sales clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, fosfato, fosfato ácido, acetato, maleato, fumarato, lactato, tartrato, citrato, gluconato, succinato, sacarato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, para-toluenosulfonato y pamoato.

Las sales básicas adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas y son ejemplos las sales de sodio, potasio, aluminio, calcio, magnesio, zinc y dietanolamina.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. [illegible] 113
Tel. [illegible] - MADRID

Una sal farmaceúticamente aceptable de un agente de la presente invención puede prepararse fácilmente mezclando disoluciones del agente y del ácido o base deseados, según sea apropiado. La sal puede precipitar de la disolución y recogerse por filtración o bien puede recuperarse por evaporación del disolvente.

El agente de la presente invención puede existir en forma polimórfica.

El agente de la presente invención puede contener uno o más átomos de carbono asimétricos y existir por lo tanto en dos o más formas estereoisoméricas. Cuando un agente contiene un grupo alquenilo o alquenileno puede aparecer también isomería cis (E) y trans (Z). La presente invención incluye los estereroisómeros individuales del agente y, cuando es apropiado, las formas tautoméricas individuales de éste, junto con las mezclas de éstas.

La separación de los diastereoisómeros o de los isómeros cis y trans puede conseguirse por técnicas convencionales, por ejemplo mediante cristalización fraccionada, cromatografía o HPLC de una mezcla estereoisomérica del agente o de una sal adecuada o de un derivado de éstos. Un enantiómero individual del agente puede prepararse también

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Zaragoza, 113
Teléf. [illegible] - MADRID

a partir del intermedio correspondiente ópticamente puro o por resolución, como por HPLC del correspondiente racemato utilizando un soporte quiral adecuado, o por cristalización fraccionada de las sales diastereoisoméricas formadas por reacción del correspondiente racemato con un ácido o base ópticamente activo, según sea apropiado.

La presente invención incluye también todas las variaciones isotópicas adecuadas del agente o de una sal farmacéuticamente aceptable de éste. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o de una sal farmacéuticamente aceptable de éste se define como uno en el que al menos un átomo está reemplazado por un átomo con el mismo número atómico pero con masa atómica diferente de la masa atómica encontrada habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse al agente y a las sales farmacéuticamente aceptables de éste, incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro como $^{2}H$, $^{3}H$, $^{13}C$, $^{14}C$, $^{15}N$, $^{17}O$, $^{18}O$, $^{31}P$, $^{32}P$, $^{35}S$, $^{18}F$ y $^{36}Cl$, respectivamente. Ciertas variaciones isotópicas del agente y de las sales farmacéuticamente aceptables de éste, por ejemplo aquellas en las que se incorpora un isótopo radiactivo como $^{3}H$ o $^{14}C$, son útiles en estudios de distribución en tejidos de medicamentos y/o sustratos. Los

PATRICIA RUIZ MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
c. Cartagena, 113
Teléf. [illegible] - MADRID

isótopos tritio, es decir $^{3}H$ y carbono 14, es decir $^{14}C$, son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos como deuterio, es decir $^{2}H$, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas debidas a una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo un aumento de la semivida in vivo o una reducción de los requerimientos de dosificación, y por lo tanto pueden preferirse en algunas circunstancias. Las variaciones isotópicas del agente de la presente invención y de las sales farmacéuticamente aceptables de éste de esta invención pueden prepararse generalmente mediante procedimientos convencionales utilizando las variaciones isotópicas apropiadas de los reactivos adecuados.

Se apreciará por los expertos en la técnica que el agente de la presente invención puede derivar de un profármaco. Los ejemplos de profármacos incluyen entidades que tienen ciertos grupos protegidos y que pueden no poseer actividad farmacológica como tales pero que pueden administrarse, en ciertos casos, (oral o parenteralmente, por ejemplo) y a continuación metabolizarse en el cuerpo para formar el agente de la presente invención que es farmacológicamente activo.

Se apreciará además que ciertos restos conocidos como

MORENO
113
MADRID

"prorrestos", por ejemplo como los descritos en "Design of Prodrugs" de H. Bundgaard, Elsevier, 1985 (cuya descripción se incorpora a la presente como referencia), pueden situarse sobre funcionalidades adecuadas de los agentes. Dichos profármacos se incluyen también en el alcance de la invención.

El $P_{cAMP}$ puede realizar una o más de las siguientes funciones: aumentar directa o indirectamente la eficacia del cAMP, aumentar directa o indirectamente los niveles de cAMP, aumentar directa o indirectamente la actividad de cAMP, reducir directa o indirectamente el nivel de degradación de cAMP o reducir directa o indirectamente el nivel de inhibición de cAMP.

Preferiblemente, el agente aumenta directa o indirectamente los niveles de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

Más preferiblemente, el agente aumenta selectivamente y directa o indirectamente los niveles de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

Más preferiblemente, el agente aumenta selectivamente directa o indirectamente los niveles de cAMP, siendo el

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID

citado cAMP, cAMP inducido por excitación sexual.

En un aspecto altamente preferido, el agente de la presente invención aumenta la cantidad relativa de cAMP inducido por excitación sexual.

Para algunas aplicaciones el agente trata selectivamente la FSAD.

En un aspecto, el agente puede inhibir o antagonizar una diana adecuada y, al hacerlo, potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales femeninos. En el texto se ha utilizado el término inhibidor para significar un inhibidor y/o un antagonista.

En otro aspecto, el agente puede activar o agonizar una diana adecuada y, al hacerlo, potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales femeninos. En el texto se han utilizado los términos activador e inhibidor de sobrerregulación para significar un activador y/o un sobrerregulador y/o un agonista.

De esta manera, el agente puede agonizar, antagonizar, sobrerregular o inhibir una diana adecuada.

[illegible] MORENO
ING. [illegible] ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telf. 516 [illegible] 90 - MADRID

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, o además, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

Preferiblemente, el agente puede agonizar selectivamente, antagonizar selectivamente, sobrerregular selectivamente o inhibir selectivamente una diana adecuada.

Preferiblemente, el agente puede agonizar selectivamente, antagonizar selectivamente, sobrerregular selectivamente o inhibir selectivamente una diana selectiva adecuada.

El agente de la presente invención puede ser capaz también de mostrar una o más propiedades funcionales beneficiosas adicionales. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede potenciar cAMP así como potenciar cGMP.

Para algunas aplicaciones (tal como para administración tópica), el agente puede mostrar también una acción inhibidora de ACE (enzima conversora de angiotensina). Para algunas aplicaciones (tal como con tipos particulares de paciente), dichos agentes (es decir aquellos que muestran acción inhibidora de ACE) pueden no ser adecuados para administración oral.

PATENTES MORENO
INGLES Y ALEMAN
113
MADRID
Telé

Para algunas aplicaciones el agente puede mostrar también una acción inhibidora de ECE (enzima conversora de endotelio).

COMBINACIONES FARMACEUTICAS

Puede utilizarse el agente en combinación con uno o más de otros agentes farmacéuticamente activos, como un $P_{cGMP}$ (como un inhibidor de fosfodiesterasa de tipo 5, por ejemplo sildenafilo, o un donante de óxido nítrico, o un precursor de óxido nítrico, por ejemplo L-arginina) y/o un compuesto farmacéutico de acción central (por ejemplo un receptor de dopamina o un agonista del receptor de melanocortina como apomorfina o melanotán II). Las explicaciones sobre el uso de apomorfina como compuesto farmacéutico pueden encontrarse en el documento US-A-5945117. En ese documento particular se suministra la apomorfina por vía sublingual. Además, o como alternativa, el agente puede utilizarse en combinación con uno o más de: inhibidor de PDE5 (por ejemplo sildenafilo, vardenafilo (Bayer BA 38-9456) e IC351 (Cialis, Icos Lilly)), uno o más de un donante de óxido nítrico (por ejemplo NMI-921), uno o más de un agonista del receptor de dopamina (por ejemplo apomorfina, Uprima, Ixsene), uno o más de un agonista del receptor de melanocortina (por ejemplo Melanotón II o PT14), uno o más

PAT H. M. MORENO
MADRID

de un abridor de canal de potasio (por ejemplo un abridor de canal $K_{ATP}$ (por ejemplo minoxidil, nicorandil)) y/o un abridor de canal de potasio activado por calcio (por ejemplo BMS-204352), uno o más de un antagonista del adrenoceptor $\alpha 1$ (por ejemplo fentolamina, Vasofem, Vasomax), uno o más de un agonista del receptor de VIP o de un análogo de VIP (por ejemplo Ro-125-1553) o un fragmento de VIP, uno o más de un antagonista del adrenoceptor $\alpha 1$ en combinación con VIP (por ejemplo Invicorp, Aviptadil), uno o más de un antagonista del adrenoceptor $\alpha 2$ (por ejemplo yohimbina), uno o más de un estrógeno, estrógeno y medroxiprogesterona o acetato de medroxiprogesterona (MPA) o un estrógeno y un agente de terapia de sustitución de la hormona metiltestosterona (por ejemplo HRT, especialmente Premarin, Cenestin, Oestrofeminal, Equin, Estrace, Estrofem, Elleste Solo, Estring, Eastradem, Eastraderm TTS, Eastraderm Matrix, Dermestil, Premphase, Prempro, Prempak, Premique, Estratest, Estratest HS, Tibolone), uno o más de un agente de sustitución de la testosterona (incluido DHEA (deshidroandrostendiona), testosterona (Tostrelle) o un implante de testosterona (Organon)), uno o más de un agente de testosterona/estradiol, uno o más de un agonista de estrógeno, por ejemplo Lasofoxifene, uno o más de un agonista o antagonista del receptor de serotonina (por ejemplo agonistas y antagonistas del receptor de 5HT1A, 5HT2C, 5HT2A y 5HT3, como se describen en el documento WO 2000/28993), uno o más de un agonista del receptor de prostanoide (por ejemplo Muse, alprostadil, misoprostol), uno o más de un agonista del receptor purinérgico (especialmente P2Y2 y P2Y4), uno o más agentes antidepresivos (por ejemplo bupropión (Wellbutrin), mirtazapina, nefazodona).

Si se administra una combinación de agentes activos, éstos pueden administrarse simultánea, separada o secuencialmente.

## COMBINACION DE VIP

Según la presente invención, el agente no es VIP (o preferiblemente no es un análogo de éste o un fragmento de éste). Sin embargo, para algunas realizaciones, el agente de la presente invención puede coadministrarse con VIP o con un análogo de éste o con un fragmento de éste.

En un aspecto altamente preferido, no se administra VIP o un análogo de éste o un fragmento de éste. Esto es debido a que ha habido informes de que las infusiones de VIP conducen a efectos cardiovasculares adversos

[illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

significativos, como aumentos del ritmo cardiaco y reducción de la presión sanguínea arterial diastólica (Ottesen 1983, 1987, 1995).

Además, aunque Ottesen y colaboradores han demostrado que VIP induce aumentos en el flujo sanguíneo vaginal y en la lubricación en voluntarias sanas, el mecanismo por el cual VIP ejerce sus efectos no está claro. En la bibliografía, existe una serie de ejemplos de señalización de VIP mediante distintos sistemas de segundo mensajero, por ejemplo cGMP/guanilato ciclasa (Ashur-Fabian, 1999), monóxido de carbono (CO)/hemo oxigenasa (Fan et al., 1998) y cAMP/adenilato ciclasa (Foda, 1995, Schoeffter, 1985, Gu, 1992). Esto se ejemplifica en un informe reciente que describe cómo pueden explicarse los efectos vasorrelajantes de VIP en la arteria uterina por la liberación de óxido nítrico (Jovanovic, 1998). De nuevo, existen también evidencias de modulación de VIP por óxido nítrico (NO)/cGMP en la función urogenital masculina (Kim, 1994).

Además, se ha informado en la bibliografía de que VIP no tiene efectos sobre los niveles de cAMP en cultivos de células de músculo liso vaginal (véase Traish, A., Moreland, R.B., Huang, Y., et al. (1999). Development of human and rabbit vaginal smooth muscle cell cultures:

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES [illegible]

Effects of vasoactive agents on intracellular levels of cyclic nucleotides. *Mol. Cell. Biol. Res. Comm.*, 2, 131-137).

Además, en estudios de seguimiento, Ottesen y colaboradores (véase Palle, Bredkjaer, Ottesen y Fahrenkrug, 1990 Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, vol 17, 61-68) informan de que el efecto de VIP sobre el flujo sanguíneo vaginal, independientemente de la vía de administración, es parte de un efecto vasodilatador sistémico más que de una respuesta local. Además, informan de una serie de efectos secundarios vasculares asociados a VIP, a saber, sofocos, hipotensión y taquicardia.

Valores de $K_i$

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención tiene preferiblemente un valor de $K_i$ inferior a aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a

PATENTIA ... MORENO ... MADRID

aproximadamente 5 nM.

### Valores de $K_b$

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención tiene preferiblemente un valor de $K_b$ menor de aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

### Valores de $K_a$

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención tiene preferiblemente un valor de $K_a$ inferior a aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a

PATRICIA [illegible]
[illegible]
Telf. [illegible] MADRID

aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

FARMACOCINETICA

Para algunas realizaciones de la presente invención, los agentes de la presente invención (por ejemplo I:NEP) tienen preferiblemente un log D de -2 a +4, más preferiblemente de -1 a +2. El log D puede determinarse por procedimientos estándar conocidos en la técnica como los descritos en J. Pharm. Pharmacol. 1990, 42:144.

Además, o como alternativa, para algunas realizaciones los agentes de la presente invención (por ejemplo I:NEP) tienen preferiblemente un flujo de células caco-2 superior a 2 x $10^{-6}cm^{-1}$, más preferiblemente superior a 5 x $10^{-6}cm^{-1}$. El valor de flujo de células caco puede determinarse por procedimientos estándar conocidos en la técnica como los descritos en J. Pharm. Sci. 79, 7, p595-600, (1990), y Pharm. Res., vol.14, n°6 (1997).

SELECTIVIDAD

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención tiene preferiblemente una selectividad de al

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Telf.

menos aproximadamente 100 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 150 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 200 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 250 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 300 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 350 veces hacia la diana deseada.

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención tiene preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 400 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 500 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 600 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 700 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 800 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 900 veces hacia la diana deseada,

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] ALEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID

preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 1000 veces hacia la diana deseada.

PROCEDIMIENTOS QUIMICOS DE SINTESIS

Típicamente el agente de la presente invención se preparará mediante técnicas químicas de síntesis.

El agente o diana de la presente invención o variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos de éste pueden producirse utilizando procedimientos químicos para sintetizar el agente por entero o en parte. Por ejemplo, pueden sintetizarse los péptidos por técnicas de fase sólida, separarse de la resina y purificarse por cromatografía líquida de alta resolución (por ejemplo Creighton (1983) Proteins Structure and Molecular Principles, WH Freeman and Co., Nueva York, NY). La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse por análisis o secuenciación de aminoácidos (por ejemplo el procedimiento de degradación de Edman, Creighton, *supra*).

La síntesis directa del agente o variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos de éste puede llevarse a cabo utilizando diversas técnicas en fase sólida (Roberge

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
[illegible] 13
MADRID
Telf. [illegible]

J.Y., et al., (1995) Science 269: 202-204) y puede conseguirse la síntesis automatizada, por ejemplo utilizando el Sintetizador de péptidos ABI 43 1 A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Además, la secuencia de aminoácidos que comprende el agente o cualquier parte de éste, puede alterarse durante la síntesis directa y/o combinarse utilizando procedimientos químicos con una secuencia de otras subunidades, o cualquier parte de ésta, para producir un agente o diana variante como, por ejemplo, una variante PDE, NEP o NPY.

En una realización alternativa de la invención, la secuencia de codificación de la diana, del agente o de variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos de éste puede sintetizarse, en todo o en parte, utilizando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers, M.H. et al., (1980) Nuc Acids Symp Ser 215-23, Horn T. et al, (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

## MIMETICO

Como se utiliza en la presente, el término "mimético" se refiere a cualquier compuesto químico que incluye, aunque no está limitado a ellos, un péptido, polipéptido,

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] 13
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

anticuerpo u otro compuesto químico orgánico que tiene la misma actividad o efecto cualitativo que el agente de referencia respecto de una diana.

DERIVADO QUIMICO

El término "derivado" o "derivatizado", como se utiliza en la presente, incluye la modificación química de un agente. Un ejemplo de dichas modificaciones químicas sería el reemplazamiento de hidrógeno por un grupo halo, un grupo alquilo, un grupo acilo o un grupo amino.

MODIFICACION QUIMICA

En una realización de la presente invención el agente puede ser un agente modificado químicamente.

La modificación química de un agente de la presente invención puede estimular o reducir la interacción de puente de hidrógeno, la interacción de cargas, la interacción hidrofóbica, la interaccion de Van der Waals o la interacción de dipolos entre el agente y la diana.

En un aspecto, el agente identificado puede actuar como un modelo (por ejemplo un molde) para el desarrollo de otros

PATRICIA [illegible] MORENO

compuestos.

PROCEDIMIENTOS RECOMBINANTES

Típicamente la diana de la presente invención para uso en el ensayo de la presente invención puede prepararse por técnicas de DNA recombinante.

POTENCIACION DE cGMP

Como se utiliza en la presente con referencia al cGMP, el término "potenciar" incluye uno o más de: aumento de la eficacia del cGMP, aumento de los niveles de cGMP, aumento de la actividad de cGMP, reducción del nivel de degradación de cGMP, reducción del nivel de inhibición de cGMP.

El efecto potenciador puede ser un efecto directo. Como alternativa, podría ser un efecto secundario y/o un efecto cadena abajo.

En este caso, el agente que potencia el cGMP actúa preferiblemente como un $I_{cGMP}$ y/o un $AM_{cGMP}$, teniendo el modulador de cGMP un efecto adverso sobre cGMP, de modo que el agente reduce y/o elimina y/o enmascara y/o desvía el efecto perjudicial del $I_{cGMP}$ y/o del $AM_{cGMP}$ hacia cGMP.

Por ello, la presente invención comprende una combinación de uno o más I:$I_{cAMP}$ y uno o más I:$I_{cGMP}$.

En un aspecto, el I:$I_{cGMP}$ es un I:$PDE_{cGMP}$.

### $I_{cAMP}$ Y/O $AM_{cAMP}$

Se ha mostrado que el cAMP media el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo) y que estimulando la señalización de cAMP se puede estimular el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo) en un modelo animal. Así, un agente que sobrerregula/estimula la vasorrelajación mediada por cAMP será eficaz en el tratamiento de los FSAD. Para facilitar la referencia, nos referimos a estas sustancias como $I_{cAMP}$ y/o $AM_{cAMP}$. En este caso, los $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ tienen un efecto adverso sobre los niveles de actividad de cAMP.

Por ello, el agente puede ser uno o más de: un I:$I_{cAMP}$ y/o un I:$AM_{cAMP}$.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

PATRICIA [illegible] MORENO
MADRID

Los ejemplos de $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ incluyen uno o más de PDE, NPY y NEP, o cualquier componente asociado con éstos. El componente asociado puede ser, por ejemplo, un receptor y/o un cofactor.

De esta manera, el agente puede ser preferiblemente uno o más de: un $I{:}PDE_{cAMP}$, un I:NPY (a veces escrito como NPYi), un I:NPY $Y_n$ (a veces escrito como NPY $Y_n$I) y un I:NEP.

De manera similar, el agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

### $I{:}I_{cAMP}$ Y/O $I{:}AM_{cAMP}$

Según la presente invención, se ha encontrado que es posible tratar y/o prevenir el FSAD utilizando un agente que reduce y/o elimina y/o enmascara y/o desvía y/o previene el efecto perjudicial de $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ hacia cAMP. El agente puede incluso restablecer los niveles de cAMP que habían reducido el $I_{cAMP}$ y el $AM_{cAMP}$. En este caso, el $I{:}I_{cAMP}$ e $I{:}AM_{cAMP}$ previenen o reducen el efecto adverso sobre los niveles de actividad del cAMP.

PATRICIA MORENO
INGLES Y
C.
Tel. MADRID

De esta manera, en un aspecto preferido, el agente es un $I{:}I_{cAMP}$ y/o un $I{:}AM_{cAMP}$, teniendo el $AM_{cAMP}$ un efecto perjudicial sobre $AM_{cAMP}$.

En un aspecto preferido, el agente puede ser uno o más de:

$I{:}PDE_{cAMP}$
$I{:}PDEn_{cAMP}$ (donde n indica una clase o subclase apropiada)
I:NPY
I:NPY $Y_n$ (donde n indica una clase o subclase apropiada)
I:NEP

$A_{cAMP}$

Según la presente invención, se ha encontrado que una de las causas importantes de los FSAD es debida a los bajos niveles o a la baja actividad de cAMP en los genitales femeninos.

Por ello, el agente puede ser un $U{:}A_{cAMP}$.

Ejemplos de $A_{cAMP}$ incluyen VIP y AC, o cualquier componente asociado a ellos. El componente asociado puede ser, por ejemplo, un receptor y/o un cofactor.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL[illegible]
C. [illegible] 13 [illegible] MADRID
Telf. [illegible]

De esta manera, el agente puede ser preferiblemente uno o más de: A:AC, A:VIPr, A:$VIP_n$, I:I:VIPr o I:I:$VIP_n$.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

## U:$A_{cAMP}$

En otro aspecto, la diana es preferiblemente un componente que aumenta el nivel de cAMP. Por ello, el agente puede ser un U:AC.

Como ejemplo, la diana puede ser el cAMP mismo o AC o VIP (o combinaciones de éstos).

Por ello, como ejemplo, el agente puede ser cualquiera de: un U:$A_{cAMP}$, un A:AC, un A:VIPr, un A:$VIP_n$, un I:I:VIPr o un I:I:$VIP_n$.

## COMBINACION DE I:$I_{cAMP}$ Y/O I:$M_{cAMP}$ Y/O U:$A_{cAMP}$

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede ser una combinación de potenciadores de cAMP. Como ejemplo,

PATRICIA
MORENO
MADRID

el agente de la presente invención puede ser dos o más de:

$I:PDE_{cAMP}$
$I:PDEn_{cAMP}$
$I:NPY$
$I:NPY\ Y_n$
$I:NEP$
$U:A_{cAMP}$
$A:AC$
$A:VIPr$
$A:VIP_n$
$I:I:VIPr$
$I:I:VIP_n$

## COMBINACION DE MIMETICO DE cAMP e $I:I_{cAMP}$ Y/O $I:M_{cAMP}$ Y/O $U:A_{cAMP}$

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede ser una combinación de un mimético de cAMP y uno o más potenciadores de cAMP. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede ser un mimético de cAMP y uno o más de:

$I:PDE_{cAMP}$
$I:PDEn_{cAMP}$

MORENO
MADRID

I:NPY

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

INHIBIDOR

El término "inhibidor", como se utiliza en la presente con respecto al agente de la presente invención, significa un agente que puede reducir y/o eliminar y/o enmascarar y/o evitar la acción perjudicial de un $I_{cAMP}$ y/o un $M_{cAMP}$ hacia cAMP. El inhibidor puede actuar como un antagonista.

ACTIVADOR

El término "activador", como se utiliza en la presente con respecto del agente de la presente invención, significa un agente que puede aumentar y/o producir y/o desenmascarar y/o elevar y/o asegurar la acción de cAMP y/o un $A_{cAMP}$. El activador puede actuar como un agonista.

PATRICIA KOCH MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
MADRID

## OTROS COMPONENTES ACTIVOS

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede estar en combinación con uno o más de otros compuestos activos, tal como uno o más agentes capaces de potenciar cGMP.

## SECUENCIA DE AMINOACIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "proteína".

La secuencia de aminoácidos puede prepararse aislada de una fuente adecuada, o puede prepararse sintéticamente o puede prepararse mediante el uso de técnicas de DNA recombinante.

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de aminoácidos que es capaz de actuar como una diana en un ensayo para la identificación de uno o más agentes y/o derivados de éstos capaces de afectar a la secuencia de aminoácidos con el fin de potenciar el cAMP para tratar FSAD.

PATRICIA [illegible] MORENO
ING [illegible]
[illegible] 13
MADRID
Telf. [illegible]

## SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de nucleótidos" es sinónimo del término "polinucleótido".

La secuencia de nucleótidos puede ser DNA o RNA de origen genómico, o sintético o recombinante. La secuencia de nucleótidos puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, representando la cadena con sentido o sin sentido o combinaciones de éstas.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente DNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos está preparada preferiblemente mediante el uso de técnicas de DNA recombinante (por ejemplo DNA recombinante).

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente cDNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos puede ser preferiblemente la misma que la forma de origen natural para este aspecto.

[illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. [illegible] 113
Teléf. [illegible] - MADRID

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una sustancia capaz de actuar como una diana en un ensayo (como un ensayo de dos híbridos de levadura) para la identificación de uno o más agentes y/o derivados de éstos capaces de afectar a la sustancia a fin de potenciar el cAMP para tratar FSAD.

Un experto en la técnica comprenderá que numerosas secuencias diferentes de nucleótidos pueden codificar las dianas de la presente invención como resultado de la degeneración del código genético. Además, se comprenderá que los expertos puedan preparar, utlizando técnicas de rutina, sustituciones de nucleótidos que no afecten sustancialmente a la actividad codificada por la secuencia de nucleótidos de la presente invención para reflejar el uso del codon de cualquier organismo huésped en el que se exprese la diana de la presente invención. De esta manera, los términos "variante", "homólogo" o "derivado", en relación con la secuencia de nucleótidos descrita en los listados de secuencias adjuntos, incluyen cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazamiento de, deleción de o adición de uno (o más) ácidos nucleicos de la secuencia o a la secuencia siempre que la secuencia de nucleótidos resultante codifique una diana funcional según la presente invención (o incluso un

[illegible] MADRID
Teléf. [illegible] - MADRID

agente según la presente invención si el citado agente comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos).

Como se ha indicado anteriormente con respecto a la homología de secuencia, existe preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90% de homología con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente. Más preferiblemente, existe al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 98% de homología. Las comparaciones de homología de nucleótidos pueden realizarse como se ha descrito anteriormente. Un programa de comparación de secuencia preferido es el programa GCG Wisconsin Bestfit descrito anteriormente. La matriz de puntuación por defecto tiene un valor de correspondencia de 10 para cada nucleótido idéntico y -9 para cada desparejamiento. La penalización por creación de un hueco por defecto es -50 y la penalización por extensión de un hueco por defecto es -3 para cada nucleótido.

La presente invención comprende también secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias presentadas en la presente, o con cualquier variante, fragmento o derivado de éstas, o con el complemento de cualquiera de las anteriores. Las secuencias de nucleótidos son preferiblemente de al menos 15 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de al menos 20, 30, 40 ó 50 nucleótidos de longitud. Estas secuencias podrían utilizarse como sondas, tal como en un estuche de diagnóstico.

## VARIANTES/HOMOLOGOS/DERIVADOS

Además de las secuencias de aminoácidos y de las secuencias de nucleótidos específicas mencionadas en la presente, la presente invención comprende también el uso de variantes, homólogos y derivados de éstas. En este caso, el término "homología" puede igualarse a "identidad".

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos un 75, 85 ó 90% idéntica, preferiblemente al menos un 95 ó 98% idéntica. En particular, la homología debería considerarse con respecto a aquellas regiones de la secuencia (como los aminoácidos de las posiciones 51, 56 y 57) conocidas por ser esenciales para una actividad. Aunque la homología puede considerarse también en términos de similitud (es decir residuos de aminoácidos con propiedades/funciones químicas similares), en el contexto

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN [illegible] 13
[illegible] MADRID

de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología pueden realizarse manualmente, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencia disponibles fácilmente. Estos programas de ordenador comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina un alineamiento "sin huecos". Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se realizan sólo sobre un número relativamente pequeño de residuos.

Aunque este es un procedimiento muy simple y consistente, no consigue tener en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o una deleción producirá que los siguientes residuos de aminoácidos estén fuera de la alineación, dando como resultado potencial una gran reducción del % de homología cuando se realiza un alineamiento global.

Consiguientemente, la mayoría de los procedimientos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta las posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente la puntuación general de homología. Esto se consigue insertando "huecos" en el alineamiento de secuencia para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan "penalizaciones de huecos" a cada hueco que aparece en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una secuencia de aminoácidos con tan pocos huecos como sea posible, lo que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas, conseguirán una mayor puntuación que una con muchos huecos. Los "costes de huecos afines" que se utilizan típicamente, cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco, y una penalización menor por cada residuo posterior al hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más habitualmente utilizado. Las penalizaciones por huecos mayores darán lugar por supuesto a alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se utiliza dicho software para comparaciones

MADRID

de secuencia. Por ejemplo, al utilizar el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase a continuación) la penalización por hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

El cálculo del máximo % de homología requiere por lo tanto primeramente la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa de ordenador adecuado para llevar a vabo dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, EE.UU., Devereux, et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencias incluyen, aunque no están limitados a ellos, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999, ibidem, capítulo 18), FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación GENEWORKS. Ambos BLAST y FASTA están disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel et al., 1999, ibidem, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit. Una nueva herramienta llamada BLAST 2 Sequences está también disponible para comparar secuencias de proteínas y nucleótidos (véanse FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50, FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el propio proceso de alineamiento típicamente no está basado en la comparación de pares todo-o-nada. En lugar de eso, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similitud graduada que asigna puntuaciones a cada comparación emparejada basada en la similitud química o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz utilizada habitualmente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el conjunto BLAST de programas. El programa GCG Wisconsin utiliza generalmente los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos habituales si se suministra (véase el manual del usuario para más detalles). Se prefiere utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz por defecto, como BLOSUM62.

Una vez el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software realiza esto típicamente como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

Las secuencias pueden tener también deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una sustancia de

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID

funcionalidad equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden realizarse sobre la base de similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicia, hidrofilia, y/o naturaleza anfipática de los residuos siempre y cuando se conserve la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos negativamente cargados incluyen ácido aspártico y ácido glutámico, los aminoácidos positivamente cargados incluyen lisina y arginina, y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados con valores de hidrofilia similar incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Las sustituciones conservativas pueden realizarse, por ejemplo, según la tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna, y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna, pueden sustituirse unos a otros.

PATRICIA KEEN MORENO
INGLES Y ALEMAN
Telf. 516 53 90 - MADRID

| | | |
|---|---|---|
| ALIFATICO | No polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar sin carga | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar cargado | D E |
| | | K R |
| AROMATICO | | H F W Y |

La presente invención comprende también que pueda ocurrir la sustitución homóloga (sustitución y reemplazamiento se utilizan ambos en la presente para significar el intercambio de un residuo de aminoácido existente por un residuo alternativo), es decir la sustitución de similar por similar, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También puede darse la sustitución no homóloga, es decir, de una clase de residuos por otra, o implicando como alternativa la inclusión de aminoácidos no naturales como ornitina (de aquí en adelante denominada Z), ornitina de ácido diaminobutírico (de aquí en adelante denominada B), ornitina norleucina (de aquí en adelante denominada O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

[illegible] 113 [illegible] - MADRID

Los reemplazamientos pueden realizarse también con aminoácidos no naturales incluyendo: aminoácidos alfa* y alfa disustituidos*, N-alquilaminoácidos*, ácido láctico*, derivados haluro de aminoácidos naturales como trifluorotirosina*, p-Cl-fenilalanina*, p-Br-fenilalanina*, p-I-fenilalanina*, L-alilglicina*, β-alanina*, ácido L-α-aminobutírico*, ácido L-γ-aminobutírico*, ácido L-α-aminoisobutírico*, ácido L-ε-aminocaproico#, ácido 7-aminoheptanoico*, L-metioninasulfona#*, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxiprolina#, L-tioprolina*, derivados metilo de fenilalanina (Phe) como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (metilo)*, L-Phe (4-isopropilo)*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico)*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-bencilo)*. La notación * se ha utilizado con los fines de la discusión anterior (relativa a la sustitución homóloga o no homóloga), para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado, mientras que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado, #* indica características anfipáticas.

Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden estar insertados entre dos residuos de aminoácidos cualesquiera de la secuencia, incluyendo grupos alquilo como grupos metilo,

PAT[illegible] [illegible]RENO
INGL[illegible]S [illegible] MAN
c. Cartagena, 113
Telef. [illegible]90 - MADRID

etilo o propilo además de espaciadores de aminoácidos como residuos de glicina o β-alanina. Otra forma de variación, que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoide, será bien comprendida por los expertos en la técnica. Para evitar dudas "la forma peptoide" se utiliza para referirse a residuos de aminoácidos variantes en los que el grupo sustituyente del carbono α está sobre el átomo de nitrógeno del residuo más que sobre al carbono α. Los procedimientos para preparar péptidos en forma peptoide son conocidos en la técnica, por ejemplo Simon, R.J., et al., PNAS (1992) 89(29), 9367-9371 y Hornwell D.C., Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

## HIBRIDACION

La presente invención comprende también el uso de secuencias que pueden hibridarse con las secuencias diana presentadas en la presente, como si el agente fuese una secuencia sin sentido.

El término "hibridación", como se utiliza en la presente, incluye "el procedimiento mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria mediante apareamiento de bases", así como el procedimiento de amplificación como el que se lleva a cabo en las

MADRID

tecnologías de reacción en cadena con polimerasa (PCR).

Las secuencias de nucleótidos de la invención capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente, o con su complemento, serán al menos un 75%, preferiblemente al menos un 85 ó 90% y más preferiblemente al menos un 95% ó 98% homólogas a las secuencias de nucleótidos complementarias correspondientes presentadas en la presente, en una región de al menos 20, preferiblemente al menos 25 ó 30, por ejemplo al menos 40, 60 ó 100 o más nucleótidos contiguos. Las secuencias de nucleótidos preferidas de la invención comprenderán regiones homólogas a la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC N° ID 2 del listado de secuencias de la presente invención, preferiblemente al menos un 80 ó 90%, y más preferiblemente al menos un 95% homólogas a la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC N° ID 2 del listado secuencias de la presente invención.

El término "selectivamente hibridable" significa que la secuencia de nucleótidos, cuando se utiliza como sonda, se utiliza en condiciones en las que se encuentra que la secuencia de nucleótidos diana se hibrida con la sonda a un nivel significativamente por encima del fondo. La hibridación de fondo puede aparecer debido a otras

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
C. Cartagena, 113
Teléf. [illegible] - MADRID

secuencias de nucleótidos presentes, por ejemplo en la biblioteca de cDNA o de DNA genómico que se rastrea. En este caso, el fondo implica un nivel de señal generada por la interacción entre la sonda y un miembro de la biblioteca de DNA no específico que tiene menos de 10 veces, preferiblemente menos de 100 veces, la intensidad de la interacción específica observada en el DNA diana. La intensidad de la interacción puede medirse, por ejemplo, por marcado radiactivo de la sonda, por ejemplo con $^{32}P$.

Las condiciones de hibridación están basadas en la temperatura de fusión (Tm) del complejo de unión del ácido nucleico, como explican Berger y Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methodos in Enzimology, Vol 152, Academic Press, San Diego, CA), y confieren un "rigor" definido como se explica a continuación.

El rigor máximo aparece típicamente a aproximadamente Tm-5°C (5°C por debajo de la Tm de la sonda), el rigor elevado a aproximadamente 5°C a 10°C por debajo de la Tm, el rigor intermedio a aproximadamente 10°C a 20°C por debajo de la Tm, y el rigor bajo a aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de la Tm. Como comprenderán los expertos en la técnica, una hibridación de rigor máximo puede utilizarse para identificar o detectar secuencias de nucleótidos

[illegible] 113
Teléf. 519 59 [illegible] - MADRID

idénticas mientras que una hibridación de rigor intermedio (o bajo) puede utilizarse para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos similares o relacionadas.

En un aspecto preferido, la presente invención cubre secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con la secuencia de nucleótidos de la presente invención en condiciones rigurosas (por ejemplo a 65°C y 0,1xSSC (1xSSC = NaCl 0,15 M, $Na_3$citrato 0,015 M, pH = 7,0). Cuando la secuencia de nucleótidos de la invención es de doble cadena, ambas cadenas del dúplex, individualmente o en combinación, están comprendidas por la presente invención. Cuando la secuencia de nucleótidos es de una cadena, se comprende que la secuencia complementaria de esa secuencia de nucleótdos está también incluida en el alcance de la presente invención.

Las secuencias de nucleótidos que no son un 100% homólogas a las secuencias de la presente invención pero que entran dentro del alcance de la invención, pueden obtenerse mediante una serie de formas. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente pueden obtenerse por ejemplo por sondeo de bibliotecas de DNA preparadas a partir de una serie de fuentes. Además, pueden obtenerse otros homólogos víricos/bacterianos o celulares,

MADRID

particularmente homólogos celulares encontrados en células de mamíferos, (por ejemplo células de rata, ratón, bovinas y de primate) y dichos homólogos y fragmentos de éstos serán en general capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente. Dichas secuencias pueden obtenerse sondeando bibliotecas de cDNA preparadas a partir de, o bibliotecas de DNA genómico a partir de otras especies animales y sondeando dichas bibliotecas con sondas que comprenden toda o parte de la secuencia de nucleótidos descrita en la presente en condiciones de medio a alto rigor. Se aplican consideraciones similares para obtener especies homólogas y variantes alélicas de las secuencias de aminoácidos y/o de nucleótidos de la presente invención.

Las variantes y homólogos de cepas/especies pueden obtenerse también utilizando PCR degenerada que utilizará cebadores diseñados para dirigirse a secuencias en las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, por alineamiento de las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencias pueden realizarse utilizando software informático conocido en la técnica. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp es ampliamente utilizado. Los cebadores utilizados en PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones de menor rigor que las utilizadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia simple frente a secuencias conocidas.

Como alternativa, dichas secuencias de nucleótidos pueden obtenerse por mutagénesis dirigida específica de sitio de secuencias caracterizadas, como la secuencia de nucleótidos descrita en SEC Nº ID 2 del listado de secuencias de la presente invención. Esto puede ser útil cuando se requieren por ejemplo cambios silenciosos de codón en las secuencias para optimizar las preferencias de codón para una célula huésped particular en la que se expresan las secuencias de nucleótidos. Pueden desearse otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o para alterar la actividad de la proteína codificada por las secuencias de nucleótidos.

Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden utilizarse para producir un cebador, por ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo marcada con un marcador revelable por medios convencionales

[illegible] 13
[illegible] - MADRID
Teléf. [illegible]

utilizando marcaje radiactivo o no radiactivo, o las secuencias de nucleótidos pueden clonarse en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos serán al menos de 15, preferiblemente al menos de 20, por ejemplo al menos de 25, 30 ó 40 nucleótidos de longitud, y están también comprendidos en el término secuencia de nucleótidos de la invención como se utiliza en la presente.

Las secuencias de nucleótidos como polinucleótidos de DNA y sondas según la invención, pueden producirse recombinantemente, sintéticamente, o mediante cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También pueden clonarse por técnicas estándar.

En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, implicando una fabricación por etapas de la secuencia de nucleótidos deseada, un nucleótido cada vez. Las técnicas para conseguir ésto utilizando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

Las secuencias de nucleótidos más largas generalmente se producirán utilizando medios recombinantes, por ejemplo utilizando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará preparar un par de cebadores (por ejemplo de aproximadamente 15 a 30

MORENO
MADRID

1207

nucleótidos) adyacentes a la región de la secuencia diana que se desea clonar, poner los cebadores en contacto con mRNA o cDNA obtenido a partir de una célula animal o humana, realizar una reacción en cadena con polimerasa (PCR) en condiciones que llevan a la amplificación de la región deseada, aislan el fragmento amplificado (por ejemplo por purificación de la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperar el DNA amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de modo que el DNA amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

Debido a la degeneración inherente al código genético, pueden utilizarse otras secuencias de DNA que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos, o una funcionalmente equivalente para clonar y expresar las secuencias diana. Como comprenderán los expertos en la técnica, para ciertos sistemas de expresión, puede ser ventajoso producir las secuencias diana con codones de origen no natural. Los codones preferidos para un huésped procariota o eucariota particular (Murray et al, (1989) Nuc Acids Res 17:477-508) pueden seleccionarse, por ejemplo, para aumentar la tasa de expresión de la diana o para producir transcriptos de RNA recombinante con propiedades deseables, como una semivida más larga que los transcriptos

MORENO
JUAN
113
MADRID

producidos a partir de secuencias de origen natural.

VECTORES DE EXPRESION

La secuencia de nucleótidos para uso como diana o para expresar la diana puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede utilizarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos en y/o a partir de una célula huésped compatible. La expresión puede controlarse utilizando secuencias de control que incluyen promotores/estimuladores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden utilizarse promotores procarióticos y promotores funcionales en células eucarióticas. Pueden utilizarse promotores específicos de tejido o específicos de estímulo. También pueden utilizarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes descritos anteriormente.

La proteína producida por una célula huésped recombinante mediante expresión de la secuencia de nucleótidos, puede segregarse o puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector utilizados. Las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de la sustancia codificada por las secuencias a través de una membrana celular

[illegible] 13 [illegible] MADRID

procariótica o eucariótica particular.

## PROTEINAS DE FUSION

La secuencia de aminoácidos diana puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo como ayuda en la extracción y purificación. Ejemplos de compañeros de proteína de fusión incluyen glutation-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a DNA y/o activación transcripcional) y β-galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de corte proteolítico entre la secuencia del compañero de la proteína de fusión y la secuencia de proteína de interés para permitir la eliminación de las secuencias de la proteína de fusión. Preferiblemente la proteína de fusión no impedirá la actividad de la diana.

La proteína de fusión puede comprender un antígeno o un determinante antigénico condensado a la sustancia de la presente invención. En esta realización, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de origen no natural que comprende una sustancia que puede actuar como coadyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmune. El antígeno o el determinante antigénico puede estar unido al extremo amino o carboxi de la sustancia.

PATENT [illegible]
ING. [illegible] AN
C. [illegible] 13
Telf. [illegible] MADRID

En otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos puede estar ligada a una secuencia heteróloga que codifica una proteína de fusión. Por ejemplo, para rastrear bibliotecas de péptidos en busca de agentes capaces de influir en la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia quimérica que exprese un epitopo heterólogo que es reconocido por un anticuerpo disponible comercialmente.

## ANTICUERPOS

En una realización de la presente invención, el agente de la presente invención puede ser un anticuerpo.

Los anticuerpos pueden producirse por técnicas estándar, tal como por inmunización con la sustancia de la invención o utilizando una biblioteca de muestra de fagos.

Para los fines de esta invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique otra cosa, incluye, aunque no está limitado a ellos, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, así como miméticos de éstos. Dichos fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos enteros que conservan su actividad de unión

PATRICIA ... MORENO

para una sustancia diana, los fragmentos Fv, F(ab') y $F(ab')_2$, así como los anticuerpos de cadena simple (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Además, los anticuerpos y fragmentos de éstos pueden ser anticuerpos humanizados, por ejemplo como se describe en la sustancia A-239400. Los anticuerpos neutralizantes, es decir, aquellos que inhiben la actividad biológica de los polipéptidos de la sustancia, son especialmente preferidos para diagnóstico y terapia.

Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un polipéptido inmunogénico que lleva un(os) epitopo(s) obtenible(s) a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención. Dependiendo de la especie huésped, pueden utilizarse diversos coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos coadyuvantes incluyen, aunque no están limitados a ellos, geles minerales de Freund como hidróxido de aluminio y sustancias activas en superficie como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa de bocallave y dinitrofenol. El BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) y el *Corynebacterium parvum* son coadyuvantes humanos

PATRICIA [illegible]
ING. [illegible]
Telf. [illegible]
MADRID

potencialmente útiles que pueden emplearse si el polipéptido de la sustancia purificado se administra a individuos inmunológicamente comprometidos con el fin de estimular la defensa sistémica.

El suero del animal inmunizado se recoge y se trata según procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales hacia un epitopo obtenible a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención contiene anticuerpos hacia otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para producir y procesar los antisueros policlonales son conocidas en la técnica. Para poder preparar dichos anticuerpos, la invención proporciona también polipéptidos de la invención o fragmentos de éstos haptenizados por otro polipéptido para uso como inmunógenos en animales o humanos.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia epitopos obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención pueden producirse fácilmente por un experto en la técnica. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas es bien conocida. Pueden crearse líneas celulares de

113 90 - MADRID

producción de anticuerpos inmortales por fusión celular, y también por otras técnicas como transformación directa de linfocitos B con DNA oncogénico, o transfección con virus Epstein-Barr. Pueden rastrearse los paneles de anticuerpos monoclonales producidos frente a epitopos de órbita para determinar diversas propiedades, es decir, la afinidad de isotipo y epitopo.

Los anticuerpos monoclonales de la sustancia y/o agente identificado de la presente invención pueden prepararse utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, aunque no están limitadas a ella, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Koehler y Millstein (1975 Nature 256:495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., (1983) Immunol. Today 4:72, Cote et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030) y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc., pág. 77-96). Además, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", así como para la separación de genes de anticuerpo de ratón de genes de anticuerpo humanos para obtener una molécula con especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas (Morrison et al.

MADRID

(1984) Prc. Natl, Acad. Sci. 81:6851-6855, Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608, Takeda et al (1985) Nature 314:452-454). Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de Estados Unidos nº 4.946.779) pueden adaptarse para producir los anticuerpos de cadena sencilla específicos de la sustancia.

Los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, que están dirigidos hacia epitopos obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención son particularmente útiles en diagnóstico, y aquellos que son neutralizantes son útiles en inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales, en particular, pueden utilizarse para excitar anticuerpos anti-idiotipo. Los anticuerpos anti-idiotipo son inmunoglobulinas que llevan una "imagen interna" de la sustancia y/o agente frente al que se desea protección.

Las técnicas para excitar anticuerpos anti-idiotipo son conocidas en la técnica. Estos anticuerpos anti-idiotipo pueden ser útiles también en terapia.

Los anticuerpos pueden producirse también por inducción de la producción in vivo de la población de linfocitos o por

MADRID

rastreo de bibliotecas de inmunoglobulinas recombinantes o paneles de reactivos de unión altamente específicos como se describen en Orlandi et al. (1989, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3822-3837) y Winter, G., y Milstein, C. (1991, Nature, 349:293-299).

También pueden generarse fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específica para la sustancia. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, aunque no están limitados a ellos, los fragmentos $F(ab')_2$ que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab que pueden generarse por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Como alternativa, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab para permitir una rápida y sencilla identificación de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse W.D., et al., (1989) Science 256:1275-128 1).

SEÑALIZADORES

Puede utilizarse una amplia variedad de señalizadores en los procedimientos de ensayo (así como en los rastreos) de la presente invención, proporcionando los señalizadores preferidos señales convenientemente detectables (por ejemplo por espectroscopía). Como ejemplo, un gen señalizador puede codificar una enzima que cataliza una reacción que altera las propiedades de absorción de luz.

Ejemplos de moléculas señalizadoras incluyen aunque no están limitadas a ellas, β-galactosidasa, invertasa, proteína de fluorescencia verde, luciferasa, cloranfenicol, acetiltransferasa, β-glucuronidasa, exo-glucanasa y glucoamilasa. Como alternativa, pueden incorporarse nucleótidos marcados radiactivamente o marcados fluorescentemente a transcriptos nacientes que se identifican después cuando se unen a las sondas de oligonucleótidos.

En una realización preferida, la producción de la molécula de señalizador se mide por la actividad enzimática del producto del gen señalizador, como la β-galactosidasa.

Se conocen en la técnica una serie de protocolos para detectar y medir la expresión de la diana, tal como utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos de la proteína. Los ejemplos incluyen enzimoinmunoensayo (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas fluorescentes (FACS). Se prefiere un inmunoensayo basado en anticuerpos

[illegible] 13 [illegible] MADRID
Telef. [illegible]

monoclonales de dos sitios, que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos con dos epitopos no interferentes en polipéptidos, pero puede emplearse un ensayo de unión competitiva. Estos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, en Hampton R., et al. (1990), Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul MN) y Maddox D.E. e al., (1983 , J. Exp. Med. 15 8:121 1).

Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de técnicas de marcaje y conjugación que pueden utilizarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir hibridación marcada a sondas PCR para detectar las secuencias del polinucleótido diana incluyen el marcaje de oligonucleótidos, traducción por muescas, marcaje terminal o amplificación por PCR utilizando un oligonucleótido marcado. Como alternativa, la secuencia de codificación, o cualquier porción de ella, puede clonarse en un vector para la producción de una sonda de mRNA. Dichos vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles y pueden utilizarse para sintetizar sondas de RNA in vitro por adición de una polimerasa de RNA apropiada como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados.

Una serie de compañías como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp. (Cleveland, OH) suministran estuches comerciales y protocolos para estos procedimientos. Las moléculas señalizadoras o marcadores adecuadas incluyen radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que explican el uso de dichos marcadores incluyen los documentos US-A-3817837, US-A-3850752, US-A-3939350, US-A-3996345, US-A-4277437, US-A-4275149 y US-A-4366241. Además, las inmunoglobulinas recombinantes pueden producirse como se muestra en el documento US-A-4816567.

Los procedimientos adicionales para cuantificar la expresión de una molécula particular incluyen el marcaje radiactivo (Melby, P.C., et al. 1993, J. Immunol. Methods 159:235-44) o la biotinilación (Duplaa, C.et al., 1993, Anal. Biochem. 229-36) de nucleótidos, la coamplificación de un ácido nucleico control y curvas estándar en las que se interpolan los resultados experimentales. La cuantificación de muestras múltiples puede acelerarse realizando el ensayo en formato ELISA, en el que el oligómero de interés se presenta a varias diluciones y la respuesta espectrofotométrica o calorimétrica proporciona una rápida cuantificación.

[illegible] 113 [illegible] Telef. 519 53 80 - MADRID

Aunque la presencia/ausencia de expresión de un gen marcador sugiere que el gen de interés está también presente, su presencia y su expresión deben confirmarse. Por ejemplo, si la secuencia de nucléotidos se inserta en una secuencia de un gen marcador, las células recombinantes que contienen el mismo pueden identificarse por la ausencia de la función del gen marcador. Como alternativa, un gen marcador puede colocarse en tándem con una secuencia de codificación diana bajo el control de un promotor simple. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o selección indica habitualmente la expresión de la diana también.

Como alternativa, las células huésped que contienen la secuencia de codificación para la diana y que expresan las regiones de codificación de la diana pueden identificarse mediante una serie de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, aunque no están limitados a ellos, la hibridación DNA-DNA o DNA-RNA y la técnica de bioensayo o inmunoensayo de proteínas, que incluyen tecnologías basadas en membrana, basadas en disoluciones o basadas en chips para la detección y/o cuantificación del ácido nucleico o de la proteína.

[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] - MADRID

## ENSAYOS GENERALES DE LA ACTIVIDAD/NIVELES DE cAMP

Puede determinarse la capacidad de un agente de ensayo para potenciar el cAMP midiendo un aumento o reducción relevante de un nivel diana. Además, o como alternativa, puede determinarse la capacidad de un agente de ensayo para potenciar el cAMP midiendo un aumento relevante de los niveles de cAMP. Como ejemplo, pueden adaptarse las explicaciones de Smith et al., 1993 (Appl. Biochem. Biotechol., 41:189-218). Existen también estuches de inmunoensayo disponibles comercialmente para la medida del cAMP (por ejemplo Amersham International, Arlington Heights, IL y DuPont, Boston, MA).. Se proporcionan los detalles de un ensayo de cAMP adecuado en la sección experimental.

## RASTREOS

Puede utilizarse cualquiera de una o más dianas adecuadas, como una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos, para identificar un $P_{cAMP}$ en cualquiera de una serie de técnicas de rastreo de medicamentos. La diana empleada en dicho ensayo puede estar libre en disolución, fijada a un soporte sólido, portada sobre una superficie celular o localizada intracelularmente. La diana puede

PATRICI[illegible] ROMERO
INGL[illegible]
C[illegible] MADRID
Telél. [illegible]

estar incluso en un modelo animal, siendo la citada diana una diana exógena o una diana introducida. El modelo animal será un modelo animal no humano. Puede medirse la anulación de la actividad de la diana o la formación de complejos de unión entre la diana y el agente a ensayar.

Las técnicas de rastreo de medicamentos pueden basarse en el procedimiento descrito en Geysen, solicitud de patente europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. En resumen, se sintetiza un gran número de diferentes compuestos de ensayo peptídicos pequeños sobre un sustrato sólido, como puntas de plástico o alguna otra superficie. Se hacen reaccionar los compuestos peptídicos de ensayo con una diana adecuada o fragmento de ésta y se lavan. Se detectan entonces las entidades unidas, por ejemplo procedimientos de adaptación adecuados bien conocidos en la técnica. También pueden recubrirse directamente con una diana purificada placas para uso en técnicas de rastreo de medicamentos. Como alternativa, pueden utilizarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

Esta invención contempla también el uso de ensayos de rastreo de medicamentos competitivos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a una diana

MADRID

compiten específicamente con un compuesto de ensayo para la unión a la diana.

Otra técnica de rastreo proporciona un rastreo de alto rendimiento (HTS) de agentes con afinidad de unión adecuada hacia las sustancias y está basado en el procedimiento descrito en el documento WO 84/03564.

Se espera que los procedimientos de ensayo de la presente invención sean adecuados para el rastreo tanto a pequeña como a gran escala de los compuestos de ensayo, así como en ensayos cuantitativos.

De esta manera, la presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian el cAMP, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de cAMP.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian selectivamente el cAMP en genitales sexuales femeninos, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada de los genitales sexuales femeninos con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de cAMP.

Teléf. 5155996 - MADRID
c/. Cartagena, 113

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian el cAMP, comprendiendo el procedimiento poner en contacto un objetivo adecuado con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles del objetivo.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de identificar agentes que potencian selectivamente el cAMP en genitales sexuales femeninos, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuado de los genitales sexuales femeninos con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles del objetivo.

En un aspecto preferido, el rastreo de la presente invención comprende al menos las siguientes etapas (que no tienen porqué estar en este mismo orden consecutivo): (a) realizar un rastreo in vitro para determinar si un agente candidato tiene la actividad relevante (tal como por modulación de PDEII y/o NEP, como NEP de riñón de perro), (b) realizar uno o más rastreos selectivos para determinar la selectividad del citado agente candidato (por ejemplo para ver si el citado agente es también un inhibidor de ACE, utilizando, por ejemplo, el protocolo de ensayo presentado en la presente) y (c) realizar un rastreo in vivo con el citado agente candidato (por ejemplo utilizando

PATRICIA [illegible]
INGLES Y [illegible]
[illegible] MADRID

un modelo animal funcional). Típicamente, si el citado agente candidato pasa el rastreo (a) y el rastreo (b), se realiza el rastreo (c).

## DIAGNOSTICOS

La presente invención proporciona también una composición o estuche de diagnóstico para la detección de una predisposición al FSAD. A este respecto, la composición o estuche comprenderá una entidad que es capaz de indicar la presencia de uno o más, o incluso la ausencia de uno o más, de las dianas en una muestra de ensayo. Preferiblemente, la muestra de ensayo se obtiene a partir de genitales sexuales femeninos o de una secreción de éstos.

Como ejemplo, la composición de diagnóstico puede comprender cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente o una variante, homólogo, fragmento o derivado de éstos, o una secuencia capaz de hibridarse con toda o con una parte de cualquiera de las secuencias de nucleótidos.

Para proporcionar una base para el diagnóstico de la enfermedad, deben establecerse valores patrón o valores normales de una diana. Esto pueden conseguirse combinando

113
MADRID

fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con un anticuerpo hacia una diana, en condiciones adecuadas para la formación de complejos, que son bien conocidas en la técnica. La cantidad de formación de complejo patrón puede cuantificarse por comparación con una serie de diluciones de controles positivos en los que se combina una cantidad conocida de anticuerpo con concentraciones conocidas de una diana purificada. Después, los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por FSAD. La desviación entre los valores patrón y los del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad.

Una diana control, o cualquier parte de ella, puede proporcionar la base para un compuesto de diagnóstico y/o terapéutico. Con fines de diagnóstico, las secuencias de polinucleótidos diana pueden utilizarse para detectar y cuantificar la expresión genética en dolencias, trastornos o enfermedades en las que pueda estar implicado el FSAD.

La secuencia de polinucleótidos que codifica la diana puede utilizarse para el diagnóstico del FSAD resultante de la expresión de la diana. Por ejemplo, las secuencias de polinuclétidos que codifican una diana pueden utilizarse

[illegible] MADRID

en ensayos de hibridación o de PCR de tejidos procedentes de biopsias o autopsias o fluidos biológicos, para detectar anormalidades en la expresión de la diana. La forma de dichos procedimientos cuantitativos o cualitativos puede incluir análisis Southern o Northern, transferencia por puntos u otras tecnologías basadas en membrana, tecnologías PCR, varillas de sondeo, tecnologías de puntas o chips, y ELISA u otras tecnologías de formato de múltiples muestras. Todas estas técnicas son bien conocidas en la técnica y son de hecho la base de muchos estuches de diagnóstico comercialmente disponibles.

Dichos ensayos pueden ajustarse para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico particular y pueden utilizarse en estudios animales, en ensayos clínicos o para monitorizar el tratamiento de un paciente individual. Para proporcionar una base para el diagnóstico de una enfermedad debe establecerse un perfil normal o patrón para la expresión de la diana. Esto se consigue combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con la diana o una porción de ésta, en condiciones adecuadas para la hibridación o amplificación. La hibridación patrón puede cuantificarse por comparación de los valores obtenidos de sujetos normales con una serie de diluciones de controles positivos ensayados en el mismo experimento, en que se utiliza una cantidad conocida de diana purificada. Los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por un trastorno o enfermedad relacionado con la expresión de la secuencia de codificación de la diana. La desviación entre los valores patrón y los del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad. Si se establece la enfermedad, se administra un agente terapéutico existente y pueden generarse valores o perfiles de tratamiento. Finalmente, puede repetirse el ensayo regularmente para evaluar si los valores se alejan o se acercan al esquema normal o patrón. Los perfiles de tratamiento sucesivos pueden utilizarse para mostrar la eficacia del tratamiento durante un periodo de varios días o varios meses.

De esta manera, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido diana o una variante, homólogo, fragmento o derivado de éste, para producir anticuerpos anti-diana que pueden, por ejemplo, utilizarse como diagnóstico para detectar y cuantificar los niveles de diana en estados de los FSAD.

La presente invención proporciona también ensayos y estuches de diagnóstico para la detección de una diana en células y tejidos, que comprenden una diana purificada que puede utilizarse como control positivo, y anticuerpos anti-diana. Dichos anticuerpos pueden utilizarse en tecnologías basadas en disoluciones, basadas en membrana o basadas en tejidos para detectar cualquier estado de enfermedad o dolencia relacionado con la expresión de la proteína diana o con la expresión de las deleciones o de una variante, homólogo, fragmento o derivado de éste.

PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO

Las composiciones y/o procedimientos y/o estuches de diagnóstico pueden utilizarse en las siguientes técnicas que incluyen, aunque no están limitadas a ellos, ensayos competitivos y no competitivos, radioinmunoensayo, ensayos de bioluminiscencia y quimioluminiscencia, ensayos fluorométricos, ensayos de "en sandwich", ensayos inmunorradiométricos, transferencia por puntos, ensayos ligados a enzimas, incluyendo ELISA, placas de microensayo, bandas recubiertas de anticuerpos o varillas de sonda para una rápida monitorización de la orina o sangre, inmunoquímica e inmunocitoquímica.

Como ejempo, un estuche inmunohistoquímico puede utilizarse

MADRID

también para la localización de actividad NEP, PDE o NPY en tejido genital. Este estuche de inmunohistoquímica permite la localización de NEP, PDE o NPY en secciones de tejido y en células cultivadas utilizando tanto microscopía óptica como electrónica, que puede utilizarse con fines tanto de investigación como clínicos. Dicha información puede ser útil para diagnóstico y posiblemente para fines terapéuticos en la detección y/o prevención y/o tratamiento de la FSD, como FSAD. Para cada estuche se establecen un intervalo, sensibilidad, precisión, fiabilidad, especificidad y reproducibilidad del ensayo. La variación intraensayo e interensayo se establece en los puntos al 20%, 50% y 80% de las curvas estándar de desplazamiento o actividad.

## SONDAS

Otro aspecto de la invención en cuestión es la provisión de sondas de hibridación de ácidos nucleicos o de PCR que son capaces de detectar (especialmente aquellas que son capaces de seleccionar selectivamente) secuencias de polinucleótidos, incluyendo secuencias genómicas, que codifican una región de codificación de la diana o moléculas estrechamente relacionadas, como alelos. La especificidad del la sonda, es decir, si deriva de una

[illegible]
INGL[illegible]
c/. Cartagena, 113
Teléf. [illegible] - MADRID

región o dominio altamente conservado, conservado o no conservado, y el rigor de la hibridación o amplificación (alto, intermedio, bajo) determinarán si la sonda identifica sólo las secuencias de codificación de la sonda de origen natural, o secuencias relacionadas. Las sondas de detección de secuencias de ácidos nucleicos relacionados se seleccionan de regiones de nucléotidos conservadas o altamente conservadas de los miembros de la familia de la diana y dichas sondas pueden utilizarse en un conjunto de sondas degeneradas. Para la detección de secuencias de ácidos nucleicos idénticas, o cuando se desea una máxima especificidad, las sondas de ácidos nucleicos se seleccionan de regiones de nucleótidos no conservadas o regiones únicas de los polinucleótidos diana. Como se utiliza en la presente, el término "región de nucleótidos no conservada" se refiere a un región de nucleótisos que es única en una secuencia de codificación de objetivo descrita en la presente y que no aparece en miembros de la familia relacionados.

La PCR, como se describe en los documentos US-A-4683195, US-A-4800195 y US-A-4965188, proporciona usos adicionales para los oligonucleótidos basados en secuencias diana. Dichos oligonucleótidos generalmente se sintetizan químicamente, pero pueden generarse enzimáticamente o

[illegible] c. [illegible] Telf. [illegible] - MADRID

producirse a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros comprenden generalmente dos secuencias de nucleótidos, una de orientación con sentido (5'->3') y otra de orientación sin sentido (3'->5') empleadas en condiciones optimizadas para la identificación de un gen o estado específico. Estos dos mismos oligómeros, conjuntos encajados de oligómeros, o incluso un conjunto degenerado de oligómeros, pueden emplearse en condiciones menos rigurosas para la detección y/o cuantificación de secuencias de DNA o RNA estrechamente relacionadas.

La secuencia de ácidos nucleicos para una diana puede utilizarse también para generar sondas de hibridación, como se ha descrito anteriormente, para mapear la secuencia genómica endógena. La secuencia puede mapearse en un cromosoma particular o en una región específica del cromosoma utilizando técnicas bien conocidas. Estas incluyen hibridación in situ para dispersiones cromosómicas (Verma et al. (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York City), preparaciones cromosómicas con clasificación de flujo o construcciones de cromosomas artificiales como YAC, cromosomas bacterianos artificiales (BAC), construcciones bacterianas PI o bibliotecas de cDNA de cromosomas simples.

c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

La hibridación in situ de preparaciones cromosómicas y las técnicas de mapeo físico, como el análisis de ligamiento utilizando marcadores cromosómicos establecidos, son inestimables en la extensión de los mapas genéticos. Pueden encontrarse ejemplos de mapas genéticos en Science (1995, 270:410 y siguientes y 1994, 265:1981 y siguientes). A menudo, la posición de un gen en un cromosoma de otra especie de mamífero puede revelar marcadores asociados incluso si el número o el brazo de un cromosoma humano particular no es conocido. Pueden asignarse nuevas secuencias a los brazos cromosómicos, o a partes de éstos, por mapeo físico. Esto proporciona información valiosa a los investigadores que buscan los genes de las enfermedades utilizando clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Una vez se ha localizado aproximadamente una enfermedad o síndrome por ligamiento genético a una región genómica particular, cualquier mapeo de secuencias de ese área puede representar genes asociados o reguladores para investigaciones posteriores. La secuencia de nucleótidos objeto de la invención puede utilizarse también para detectar diferencias en la localización cromosómica debida a translocación, inversión, etc., entre individuos normales, portadores o afectados.

[illegible]
[illegible] 113
Telé. [illegible] MADRID

CELULAS HUESPED

El término "célula huésped" en relación con la presente invención incluye cualquier célula que podría comprender la diana del agente de la presente invención.

De esta manera, otra realización de la presente invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas con un polinucleótido que es o que expresa la diana de la presente invención. Preferiblemente, el citado polinucleótido se lleva en un vector de replicación y expresión de los polinucleótidos que son la diana o que expresan la diana. Las células se elegirán para que sean compatibles con el citado vector y pueden ser por ejemplo células procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levadura o de plantas.

La bacteria gram-negativa *E. coli* se utiliza ampliamente como huésped para la expresión de genes heterólogos. Sin embargo, tienden a acumularse grandes cantidades de proteína heteróloga dentro de la célula. La purificación posterior de la proteína deseada de las proteínas intracelulares de *E. coli* en bruto puede ser difícil a veces.

c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

En contraposición con *E. coli*, las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como huéspedes heterólogos por su capacidad de segregar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como huéspedes son las de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención, y/o del deseo de un procesamiento posterior de la proteína expresada, pueden preferirse huéspedes eucarióticos como levaduras u otros hongos. En general, se prefieren las células de levadura frente a las células fúngicas porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas las segregan mal las células de levadura, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo hiperglicosilación en levadura). En estos casos, debe seleccionarse un organismo huésped fúngico diferente.

Ejemplos de huéspedes de expresión adecuados dentro del alcance de la presente invención son hongos como la especie *Aspergillus* (como las descritas en el documento EP-A-0184438 y EP-A-0284603) y especie *Trichoderma*, bacterias como la especie *Bacillus* (como las descritas en los documentos EP-A-0134048 y EP-A-0253455), la especie *Streptomyces* y especie *Pseudomonas* y levaduras como la

INGLES Y ALEMAN
113
MADRID

especie *Kluyveromyces* (como las descritas en los documentos EP-A-0096430 y EP-A-0301670) y la especie *Saccharomyces*. Como ejemplo, los huéspedes de expresión típicos pueden seleccionarse de *Aspergillus niger, Aspergillus niger var. tubigensis, Aspergillus niger var. awamori, Aspergillus aculeatis, Aspergillus nidulans, Aspergillus orvzae, Trichoderma reesei, Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bacillus amyloliquefaciens, Kluyveromyces lactis y Saccharomyces cerevisiae.*

El uso de células huésped adecuadas, como células huésped de levaduras, hongos y plantas, puede proporcionar modificaciones post-transcripcionales (por ejemplo miristoilación, glicosilación, truncado, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) como puede ser necesario para conferir una actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinante de la presente invención.

ORGANISMO

El término "organismo" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que podría comprender la diana según la presente invención y/o productos obtenidos de ésta. Los ejemplos de organismos pueden

MORENO
AN
113
MADRID

incluir un hongo, levadura o planta.

El término "organismo transgénico" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprende la diana según la presente invención y/o los productos obtenidos.

## TRANSFORMACION DE CELULAS HUESPED/ORGANISMOS HUESPED

Como se indicó anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las explicaciones sobre la transformación de huéspedes procarióticos está bien documentada en la técnica, por ejemplo véase Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2° edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

Si se utiliza un huésped procariótico, puede ser necesario modificar la secuencia de nucleótidos antes de la transformación, tal como por eliminación de intrones.

En otra realización, el organismo transgénico puede ser una

MADRID

levadura. A este respecto, las levaduras también se han utilizado ampliamente como vehículo para la expresión de genes heterólogos. La especie *Saccharomyces cerevisiae* tiene una larga historia de uso industrial, incluyendo su uso para la expresión de genes heterólogos. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido revisada por Goodey et al (1987, Yeast Biotechnology, D.R. Berry et al., eds., pág. 401-429, Allen y Unwin, Londres) y por King, et al. (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E.F. Walton y G.T. Yarronton, eds., pág. 107-133, Blackie, Glasgow).

Por varias razones, *Saccharomyces cerevisiae* es adecuada para la expresión de genes heterólogos. En primer lugar, no es patogénica para humanos y es incapaz de producir ciertas endotoxinas. En segundo lugar, tiene una larga historia de uso seguro durante siglos de explotación comercial con varios fines. Esto ha llevado a una amplia aceptación del público. En tercer lugar, el uso comercial e investigación dedicadas al organismo ha dado como resultado una riqueza de conocimientos sobre su genética y fisiología así como sobre las características de fermentación a gran escala de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se proporciona una revisión de los principios de la

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS [illegible]
c. [illegible] 113 [illegible] MADRID
Teléf. 519[illegible]

expresión de genes heterólogos en Sacccharomyces cerevisiae y de la secreción de productos genéticos en H. Hinchcliffe, E. Kenny (1993, "Yeast as a vehicule for the expression of heterologous genes", Yeasts, vol 5, Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, eds., 2ª edición, Academic Press Ltd.).

Están disponibles varios tipos de vectores de levaduras, incluyendo vectores integradores, que necesitan la recombinación con el genoma del huésped para su mantenimiento y la replicación autónoma en vectores plásmidos.

Para preparar Saccharomyces transgénica, se preparan las construcciones de expresión por inserción de la secuencia de nucleótidos de la presente invención en una construcción diseñada para la expresión en levadura. Se han desarrollado varios tipos de construcciones utilizadas para la expresión heteróloga. Las construcciones contienen un promotor activo en levadura fusionado con la secuencia de nucleótidos de la presente invención, habitualmente se utiliza un promotor de origen de levadura, como el promotor GAL1. Habitualmente se utiliza una secuencia señal proveniente de levadura, como la secuencia que codifica el péptido señal SUC2. Un terminador activo de levadura termina el sistema de expresión.

MORENO
MAN
MADRID

Para la transformación de levaduras se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, puede prepararse una Saccharomyces transgénica según la presente invención siguiendo las expliaciones de Hinnen et al. (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929), Beggs, J.D. (1978, Nature, Londres, 275, 104) e Ito, H. et al. (1983, J. Bacteriology 153, 163-168).

Las células de levadura transformadas se seleccionan utilizando diversos marcadores selectivos. Entre los marcadores utilizados para la transformación existe una serie de marcadores auxotróficos como LEU2, HIS4 y TRP1, y marcadores de resistencia a antibióticos dominantes como marcadores del antibiótico aminoglicósido, por ejemplo G418.

Otro organismo huésped es una planta. El principio básico en la construcción de plantas genéticamente modificadas es insertar información genética en el genoma de la planta de modo que se obtenga un mantenimiento estable del material genético insertado. Existen algunas técnicas para la inserción de información genética, siendo las dos principales la introducción directa de la información genética y la introducción de la información genetica mediante el uso de un sistema de vector. Puede encontrarse

113
MADRID

una revisión de las técnicas generales en los artículos de Potrykus (Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech Marzo/abril 1994 17-27). Pueden encontrarse otras explicaciones sobre transformación de plantas en el documento EP-A-0449375.

De esta manera, la presente invención proporciona también un procedimiento de transformación de una célula huésped con una secuencia de nucleótidos que debe ser la diana o que debe expresar la diana. Las células huésped transformadas con la secuencia de nucleótidos pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede segregarse o puede contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector utilizado. Como comprenderán los expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirijan las secreción de las secuencias de codificación a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular. Otras construcciones recombinantes pueden unir la secuencia de codificación a la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de las proteínas

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] Y ALEMAN
C. Cartagena, 113
Tel. [illegible] - MADRID

solubles (Kroll D.J. et al, (1993), DNA Cell. Biol. 12:441-53).

COMPOSICIONES FARMACEUTICAS

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo combinaciones de éstos).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria y comprenderá típicamente uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos o diluyentes para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen en, por ejemplo Pharmaceutical Sciences de Remington, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit., 1985). La selección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede hacerse con respecto a la vía prevista de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmaceúticas pueden comprender como vehículo, excipiente o diluyente, o además de los mismos, cualquier ligante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento o agente(s) de

[illegible] 113 [illegible] MADRID

solubilización.

Pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, tintes y agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido para-hidroxibenzoico. También pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión.

Puede haber diferentes requerimientos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de suministro. Como ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para suministrarse utilizando una minibomba o por vía mucosa, por ejemplo en forma de un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o disolución ingerible, o parenteralmente, en la que la composición se formula en una forma inyectable para suministro, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Como alternativa, la formulación puede diseñarse para ser suministrada por ambas vías.

Cuando el agente se va a suministrar por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debería ser capaz de permancer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal, por ejemplo debería ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detersivos de la bilis.

Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inhalación, en forma de supositorio o de pesario, tópicamente en forma de una loción, disolución, crema, ungüento o polvo, utilizando un parche dérmico, oralmente en forma de comprimidos que contienen excipientes como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, disoluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse preferiblemente en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o monosacáridos suficientes para hacer la disolución isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas que pueden formularse de manera convencional.

Preferiblemente, el agente está en una forma que es adecuada para suministro oral.

[illegible] MORENO
[illegible]AN
[illegible]13
[illegible] - MADRID
Telf. 519 [illegible] 90

Para algunas realizaciones el agente, cuando se utiliza, preferiblemente no actúa sobre el sistema nervioso central.

Para algunas realizaciones el agente, cuando se utiliza, preferiblemente es de actuación periférica.

## ADMINISTRACION

El término "administrado" incluye el suministro por técnicas víricas o no víricas. Los mecanismos de suministro vírico incluyen, aunque no están limitados a ellos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores víricos de herpes, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos y vectores baculovíricos. Los mecanismos de suministro no vírico incluyen transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, compuestos anfifílicos faciales catiónicos (CFA) y combinaciones de éstos.

Los agentes de la presente invención pueden administrarse por separado, pero generalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, por ejemplo cuando el agente está mezclado con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado con respecto a la vía prevista de administración y a la

[illegible] MORENO
ING [illegible]
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 58 90 - MADRID

práctica farmacéutica estándar.

Pro ejemplo, el agente puede administrarse (por ejemplo oral o tópicamente) en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, por pulsos o controlada.

Los comprimidos pueden contener excipientes como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio y glicina, disgregantes como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos y ligantes de granulación como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además pueden incluirse agentes lubricantes como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles

[illegible] MADRID

de alto peso molecular. Para las suspensiones acuosas y/o elixires, el agente puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, material colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de éstos.

Las vías de administración (suministro) incluyen, aunque no están limitadas a las mismas, una o más de:

oral (por ejemplo en forma de comprimido, cápsula o en forma de disolución ingerible)
tópica
mucosa (por ejemplo en forma de pulverizador nasal o aerosol para inhalación)
nasal
parenteral (por ejemplo en una forma inyectable),
gastrointestinal
intraespinal
intraperitoneal
intramuscular
intravenosa
intrauterina
intraocular
intradérmica

[illegible] 90 - MADRID

intracraneal
intratraqueal
intravaginal
intracerebroventricular
intracerebral
subcutánea
oftálmica (incluyendo intravitreal o intracameral)
transdérmica
rectal
bucal
vaginal
epidural
sublingual.

Se comprenderá que no todo el agente necesita administrarse por la misma vía. Probablemente, si la composición comprende más de un componente activo, esos componentes pueden administrarse por vías diferentes.

Si el agente de la presente invención se administra parenteralmente, los ejemplos de dicha administración incluyen uno o más de: administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intrasternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea del agente, y/o utilizando

PAT. ING. C. Tel. 519 - MADRID

técnicas de infusión.

Para la administración parenteral, el agente se utiliza mejor en la forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o glucosa suficiente para hacer la disolución isotónica con la sangre. Las disoluciones acuosas deberán estar adecuadamente tamponadas (preferiblemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se consigue fácilmente por ténicas farmacéuticas estándar conocidas por los expertos en la técnica.

Como se ha indicado, el agente de la presente invención puede administrarse intranasalmente o por inhalación y se suministra convenientemente en forma de una presentación de inhalador de polvo seco o de aerosol pulverizador de envase a presión, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un impulsor adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A™) o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA™), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la dosis unitaria puede determinarse proporcionando una válvula para

MADRID

suministrar una cantidad medida. El envase a presión, bomba, pulverizador o nebulizador puede contener una disolución o un suspensión del compuesto activo, por ejemplo utilizado una mezcla de etanol y el impulsor como disolvente, que puede contener además un lubricante, por ejemplo trioleato de sorbitano. Las cápsulas y cartuchos (preparados por ejemplo a partir de gelatina) para uso en un inhalador o insuflador, pueden formularse para contener una mezcla de polvos del agente y una base en polvo adecuada como lactosa o almidón.

Como alternativa, el agente de la presente invención puede administrarse en forma de supositorio o de pesario, o puede aplicarse tópicamente en forma de un gel, hidrogel, loción, disolución, crema, ungüento o polvo. El agente de la presente invención puede administrarse también por vía dérmica o transdérmica, por ejemplo mediante el uso de un parche dérmico. También puede administrarse por vía pulmonar o rectal. También puede administrarse por vía ocular. Para uso oftálmico, los compuestos pueden formularse como suspensiones micronizadas en suero salino isotónico de pH ajustado o, preferiblemente, como disoluciones en suero salino estéril isotónico con pH ajustado opcionalmente, en combinación con un conservante como cloruro de bencilalconio. Como alternativa, puede formularse en forma de ungüento tal como vaselina.

Para la aplicación tópica a la piel, el agente de la presente invención puede formularse como un ungüento adecuado que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulsionadora y agua. Como alternativa, puede formularse como una loción o crema adecuada, suspendida o disuelta en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoesteraro de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de cetilésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por inyección directa.

Para algunas aplicaciones, el agente preferiblemente se administra oralmente.

Para algunas aplicaciones, el agente preferiblemente se administra tópicamente.

NIVELES DE DOSIS

Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual. El nivel específico de dosis y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente en particular pueden variar y dependerán de una serie de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, modo y momento de administración, la tasa de excreción, la combinación de medicamentos, la gravedad de la dolencia particular y la terapia individual experimentada. El agente y/o composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse según un régimen de 1 a 10 veces al día, tal como una o dos veces al día.

Para administración oral y parenteral a pacientes humanos, el nivel de dosificación diario del agente puede ser en dosis simples o divididas.

Dependiendo de la necesidad, el agente puede administrarse a una dosis desde 0,01 a 30 mg/kg de peso corporal, tal como de 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal. Naturalmente, las dosificaciones

FATIMA [illegible] MORENO
[illegible] Y [illegible]AN
[illegible] 113
[illegible] MADRID

mencionadas en la presente son ilustrativos del caso medio. Puede haber casos individuales, por supuesto, en que sean necesarios intervalos de dosificación mayores o menores.

## MODELOS DE ENSAYO ANIMAL

Pueden utilizarse modelos in vivo para investigar y/o diseñar terapias o agentes terapéuticos para tratar FSAD. Los modelos podrían utilizarse para investigar el efecto de diversas herramientas/compuestos líder sobre una serie de parámetros que indican la respuesta de excitación sexual. Estos modelos de ensayo animal pueden utilizarse como, o en, el ensayo de la presente invención. El modelo de ensayo animal será un modelo de ensayo no humano.

Existe una serie de modelos animales para la disfunción sexual femenina vasculogénica (FSAD) disponibles que pueden utilizarse.

Como ejemplo, puede hacerse referencia a modelos animales invasivos (por ejemplo véase Park et al., 1997). En este caso, las respuestas hemodinámicas vaginal y clitorídea pueden registrarse directamente a continuación de la estimulación del nervio pélvico en conejos hembras normales y ateroscleróticos (un modelo validado de los FSAD). Los

MADRID

efectos in vivo de los potenciadores de cAMP, tales como agentes vasodilatadores como antagonistas NPY o agonistas VIP, pueden investigarse en animales normales o con FSAD.

Como otro ejemplo, puede hacerse referencia a modelos animales no invasivos (por ejemplo véase la revisión de Goldstein et al., 1998, Laan et al., 1998). En este caso, la ultrasonografía de onda Doppler por pulsos proporciona el medio para detectar los cambios de flujo sanguíneo en las arterias vaginal y clitorídea. Este modelo puede utilizarse para investigar los efectos vasculogénicos durante la administración de vasodilatadores.

Otras técnicas no invasivas que pueden utilizarse incluyen fotopletismografía vaginal, que proporciona una medida cuantitativa de la congestión de la mucosa vaginal, y técnicas de compensación térmica vaginal, que están basadas en el principio de que los cambios en el flujo sanguíneo vaginal pueden registrarse midiendo la transferencia de calor de una sonda intravaginal mantenida a temperatura constante.

En un aspecto preferido, se utiliza un modelo no invasivo de los FSAD.

## UN MODELO ANIMAL DE EXCITACION SEXUAL

En los estudios de los presentes autores, se ha desarrollado un modelo reproducible y robusto de la fisiología de la excitación sexual. Este modelo utiliza un conejo anestesiado y emplea tecnologías de láser Doppler para monitorizar el flujo sanguíneo genital registrando rutinariamente los parámetros cardiovasculares. Se pueden medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo vaginal (e incluso clitorídeo) inducido por la estimulación del nervio pélvico o por infusión de VIP en ausencia y en presencia de los agentes de ensayo.

Se cree que dicho modelo animal refleja directamente los datos clínicos. Por ello, este modelo puede utilizarse para estudiar agentes candidatos para el tratamiento de los FSAD, midiendo la estimulación del flujo sanguíneo vaginal o clitorídeo.

## MEDIDA FISIOLOGICA DE LA EXCITACION SEXUAL FEMENINA

Según la presente invención, pueden utilizarse una serie de técnicas diferentes para medir el flujo sanguíneo clitorídeo y vaginal. Como ejemplo, puede hacerse uso de fotopletismografía vaginal, técnica de eliminación del

MADRID

calor vaginal, MRI vaginal y clitorídeo de contraste mejorado, imágenes clitorídeas/vulvares por pulsos de láser Doppler y ultrasonografía clitorídea.

La cuantificación de la lubricación vaginal puede medirse también por técnicas conocidas en la técnica, como (a) pesado pre- y post-estimulación de tampones vaginales, y (b) medida del pH del fluido vaginal. Con respecto al último aspecto, el medio ácido normal en reposo en la vagina se hace más alcalino al acercarse al pH de la sangre cuando aparece la trasudación de fluido durante la estimulación sexual.

PDE (fosfodiesterasa)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es una PDE (fosfodiesterasa).

Se sabe que los nucleótidos cíclicos, como cAMP y cGMP, son importantes segundos mensajeros intracelulares. Las nucleótidos cíclicos fosfodiesterasas, también conocidas como PDE, son una familia de enzimas que catalizan la degradación de nucleótidos cíclicos y, al hacerlo, son uno de los componentes celulares que regulan la concentración de nucleótidos cíclicos.

En años recientes, se han definido al menos siete enzimas PDE (como PDEI - PDEVII), así como muchos subtipos de estas enzimas, basándose en la afinidad de sustrato y los requerimientos de cofactores (Beavo, J.A. y Reifsnyder, D.H., Trends Pharmacol. Sci. 11:150 (1990), Beavo, J., en: Cyclic Nucleotides Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action, Beavo, J. y Housley, M.D. (Eds.) Wiley:Chichester, pág. 3-15 (1990).

Ejemplos de PDE incluyen: PDEI que es una PDE dependiente de $Ca^{2+}$/calmodulina, PDEII que es una PDE estimulada por cAMP y cGMP, PDEIII que es una PDE inhibida por cGMP, PDEIV que es una PDE de alta afinidad específica de cAMP y PDEV que es una PDE específica de cGMP. Las PDEI y restantes se denominan a veces PDE de tipo I, y restantes o PDE de tipo 1, y restantes.

Cada familia de PDE puede contener dos o más isoformas (es decir puede haber dos o más isoenzimas PDE). Como ejemplo, la PDEIV de mamífero, la homóloga del gen Dunce de *Drosophila* (Chen, C.N. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (EE.UU.) 83:9313 (1986)) se sabe que tiene cuatro isoformas en rata (Swinnen J.V., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (EE.UU.) 86:5325 (1989)). Se sabe también que las PDE humanas aparecen como isoformas y que tienen variantes de

[illegible] MORENO
[illegible] 113
Telef. [illegible] - MADRID

corte y empalme. Por ejemplo, se informó de la clonación de una isoforma humana de PDEIV de monocitos en 1990 (Livi G.P. et al., Mol. Cell. Bio., 10:2678 [1990]). Como otro ejemplo, otros investigadores han clonado independientemente tres variantes de corte y empalme de PDEIV, que se designan ahora como hPDEIV-B1, hPDEIV-B2 y hPDEIV-B3.

Las explicaciones sobre nucleótido cíclico fosfodiesterasas pueden encontrarse también en los documentos US-A-5932423 y US-A-5932465.

Las explicaciones sobre otras nucelótido cíclico fosfodiesterasas, es decir CN PCDE8, pueden encontrarse en el documento WO-A-97/35989. Según el documento WO-A-97/35989, la CN PCDE8 tiene dos isoenzimas, que se designaron CN PCDE8A y CN PCDE8B. El término "isoenzima" se refiere a veces en la técnica como "isoforma".

Según el documento WO-A-97/35989, se han identificado muchos inhibidores de diferentes PDE y algunos han experimentado evaluación clínica. Por ejemplo, los inhibidores de PDEIII se están desarrollando como agentes antitrombóticos, como agentes antihipertensivos y como agentes cardiotónicos útiles en el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva. Se ha utilizado rolipram, un inhibidor de PDEIII, en el tratamiento de la depresión y otros inhibidores de PDEIII están sometidos a evaluación como agentes antiinflamatorios. Se ha mostrado que el rolipram inhibe la TNF-alfa inducida por lipopolisacárido (LPS), que se ha mostrado que estimula la replicación de VIH-1 in vitro. Por lo tanto, el rolipram puede inhibir la replicación de VIH-1 (Angel et al., 1995, AIDS 9:1137-44). Además, basándose en su capacidad para suprimir la producción de TNF alfa y beta y del interferón gamma, el rolipram se ha mostrado eficaz en el tratamiento de encefalomielitis, el modelo animal experimental de esclerosis múltiple (Sommer et al., 1995, Nat. Med. 1:244-248) y puede ser eficaz en el tratamiento de disquinesia tardía (Sasaki et al., 1995, Eur. J. Pharmacol. 282:71-76).

Según el documento WO-A-97/35989, existen también inhibidores de PDE no específicos, como teofilina, utilizada en el tratamiento del asma bronquial y otras enfermedades respiratorias, y pentoxifilina, utilizada en el tratamiento de claudicación intermitente y enfermedades vasculares periféricas inducidas por la diabetes. La teofilina se cree que actúa sobre la función del músculo liso de las vías aéreas así como en una capacidad antiinflamatoria o inmunomodulatoria en el tratamiento de enfermedades respiratorias (Banner et al, 1995, Respir. J. 8:996-1000) donde se cree que actúa inhibiendo la hidrólisis tanto de cAMP CN PDE como de cGMP (Banner et al., 1995, Monaldi Arch. Chest. Dis. 50:286-292). La pentoxifilina, también conocida por bloquear la producción de TNF-alfa, puede inhibir la replicación de VIH-1 (Angel et al, supra). Se da una lista de inhibidores de CN PDE en Beavo, 1995, supra.

Se ha sugerido que los inhibidores selectivos de PDE, además de sus isoenzimas y sus isotipos, conducirán a una terapia más eficaz con menos efectos secundarios. Por ejemplo, véanse las explicaciones de las revisiones de Wieshaar R.E., et al., (J. Med. Chem., 28:537[1985]), Giembycz M.A., (Biochem. Pharm., 43:2041 [1992]) y Lowe J.A. y Cheng J.B. (Drugs of the Future, 17:799-807 [1992]).

De esta manera, para algunas aplicaciones es deseable tener una inhibición selectiva de un tipo individual de PDE.

Las explicaciones de los antecedentes sobre las PDE han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a PDE2 o PDE estimulada por cGMP se ha extraído de esa fuente.

1260

"Los nucleótidos cíclicos funcionan como segundos mensajeros que median una serie de respuestas celulares ante señales extracelulares como hormonas, luz y neurotransmisores. Las nucleótido cíclico fosfodiesterasas (PDE) juegan un papel en la transducción de la señal por regulación de las concentraciones celulares de los nucleótidos cíclicos. Las células de mamíferos contienen múltiples PDE que se distinguen en al menos 7 familias basadas en su afinidad de sustrato y en su sensibilidad selectiva hacia cofactores y medicamentos inhibidores. Estas familias son: (I) PDE dependientes de Ca$^{2+}$/calmodulina, (II) PDE estimuladas por cGMP, (III) PDE inhibidas por cGMP, (IV) PDE específicas de cAMP, (V) PDE específicas de cGMP, (VI) PDE fotoreceptoras y (VII) PDE de alta afinidad específicas de cAMP. A partir de la secuencia de aminoácidos, es evidente que todas estas familias de PDE contienen un dominio relacionado, que se piensa que es el dominio catalítico, con aproximadamente un 30% de identidad de secuencia entre las familias. Los miembros de la misma familia están relacionados más estrechamente, comparten el 60-80% de la identidad de secuencia a lo largo de toda la región de codificación.

Michaeli et al. (1993) establecieron un rastreo funcional altamente sensible para el aislamiento de cDNA que codifica cAMP fosfodiesterasas por complementación de los defectos en la cepa Saccharomyces cerevisiae que carece de ambos genes de cAMP PDE endógenos, PDE1 y PDE2. Se aislaron tres grupos de cDNA correspondientes a 3 genes humanos distintos que codificaban PDE específicas de cAMP a partir de una biblioteca de cDNA de glioblastoma humano utilizando este rastreo funcional. Dos de los genes estaban estrechamente relacionados con la PDE específica de cAMP "dunce" de Drosophila. El tercer gen, al que Michaeli et al. (1993) se refirieron como HCP1, codificaba una nueva PDE específica de cAMP. El HCP1 tenía una secuencia de aminoácidos relacionada con las secuencias de los dominios catalíticos de todas las nucleótido cíclico PDE. Es una PDE de alta afinidad específica de cAMP que no comparte otras propiedades de la familia de PDE específicas de cAMP, sin embargo. La actividad PDE de HCP1 no era sensible a cGMP u otros inhibidores de las PDE inhibibles por cGMP. Las propiedades bioquímicas y farmacológicas de HCP1 sugirieron a Michaeli et al. (1993) que era un miembro de una familia de nucleótido ciclico PDE no descubierta anteriormente, que se designó como la

MADRID

> familia VII. Los análisis de transferencia Northern indicaron la presencia de altos niveles de RNA de HCP1 en músculo esquelético humano.
>
> Por análisis de transferencia Southern de líneas celulares híbridas, Milatovich et al. (1994) mapearon el locus de HCP1 en el cromosoma 8, por estudio de las líneas celulares híbridas somáticas que contenían diferentes regiones del cromosoma 8, regionalizaron la asignación de 8q13-q22. Han et al. (1998) mapearon el gen PDE7A en 8q13 mediante fluorescencia de hibridación in situ. Por análisis retrocruzado interespecífico, mapearon el gen Pde7A de ratón en la región proximal del cromosoma 3."

Las explicaciones de los antecedentes sobre PDE2 han sido presentadas por Jennifer P. Macke et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a PDE2 estimulada por cGMP se ha extraido de esa fuente.

> "Rosman et al. (1997) clonaron un cDNA correspondiente a PDE2A humana. El gen de PDE2A codifica un polipéptido de 941 aminoácidos con una masa molecular prevista de 106 kD. La secuencia de proteína es un 90% idéntica a las secuencias de PDE2A

[illegible] MORENO
[illegible] 13
Tel. [illegible]

bovina y de rata. El análisis de transferencia Northern mostró que el PDE2A se expresaba como un mRNA de 4,2 kb a niveles variables en todos los tejidos humanos ensayados, con la gran excepción del cerebro. Los estudios de expresión revelaron que la PDE2A hidroliza cAMP y cGMP y es inhibida por el inhibidor EHNA específico de PDE2A."

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de las PDE están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En un aspecto, la diana de PDE se selecciona de una o más de las siguientes enzimas PDE: PDE$_{\mathrm{cAMP}}$ 1, PDE$_{\mathrm{cAMP}}$ 2, PDE$_{\mathrm{cAMP}}$ 3, PDE$_{\mathrm{cAMP}}$ 4, PDE$_{\mathrm{cAMP}}$ 7 y PDE$_{\mathrm{cAMP}}$ 8..

En un aspecto más preferido, la diana de PDE se selecciona de una o más de las siguientes enzimas PDE: PDE$_{\mathrm{cAMP}}$ 1, PDE$_{\mathrm{cAMP}}$ 2, PDE$_{\mathrm{cAMP}}$ 3 y PDE$_{\mathrm{cAMP}}$ 4.

Preferiblemente, para la presente invención, la PDE para la diana es al menos PDE2.

## I:PDE

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:PDE.

Los aspectos amplios de este aspecto de la presente invención se refieren por lo tanto a:

a) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

b) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), siendo el citado agente un I:PDE.

c) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el citado procedimiento el suministro a la hembra de un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

d) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

e) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente un I:PDE.

f) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD) o para prevenir FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un I:PDE.

Otros aspectos de la presente invención comprenden:

A) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES [illegible]
[illegible] MADRID

cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

B) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, y siendo el citado agente un I:PDE.

C) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

D) Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el

[illegible] 113
Tel. 519 [illegible] - MADRID

cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, y siendo el citado agente un I:PDE.

E) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

F) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra y siendo el citado agente un I:PDE.

G) Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de la hembra de modo que produzca un

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL[illegible] [illegible]AN
[illegible] 113
[illegible]RID

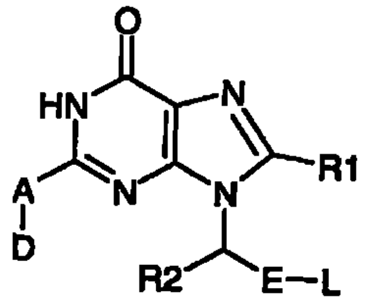
aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), y siendo el citado agente un I:PDE.

Ejemplos de I:PDE se describen en los documentos EP-A-091133 y EP-A-0771799.

Preferiblemente, el I:PDE es un I:PDE2. Así, los ejemplos de compuestos preferidos son los presentados en el documento EP-A-0771799.

Por conveniencia, la reivindicación 1 del documento EP-A-0771799 se repite ahora:

Un derivado de puri-6-ona de fórmula general (I):



en la que

$R^1$ representa hidrógeno o un alquilo lineal o

| | |
|---|---|
| | ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono, |
| $R^2$ | representa un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono opcionalmente sustituido con hidroxilo, azido o un grupo de fórmula $-NR^3R^4$ o $-OSO_2R^5$, en la que |
| $R^3$ y $R^4$ | son idénticos o diferentes y representan un cicloalquilo que contiene de 3 a 6 átomos de carbono, hidrógeno, formilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con un alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado, conteniendo respectivamente hasta 6 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $-(CO)_a-NR^6R^7$, en la que |
| a | es el número 0 o 1, |
| $R^6$ y $R^7$ | son idénticos o diferentes y representan hidrógeno, formilo, hidroxilo, fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con hidroxilo o un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, o |

| | |
|---|---|
| $R^3$ y/o $R^4$ | representan un alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, un carboxilo o un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido con hidroxilo o un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, o |
| $R^3$ y/o $R^4$ | representan un residuo de fórmula $-(CO)_b-T-NR^8R^9$, $-CO-R^{10}$, $-SO_2R^{11}$ o $-SO_2NR^{12}R^{13}$, en el que |
| b | tiene el significado dado anteriormente para a y es idéntico a éste o diferente de éste. |
| T | puede representar un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, o cuando b no es 0, puede representar también un enlace, |
| $R^8$ y $R^9$ | tienen el significado dado para los $R^6$ y $R^7$ anteriores y son idénticos a éstos o diferentes de éstos, |
| $R^{10}$ | representa un heterociclo saturado, parcialmente saturado o insaturado de 5 a 7 miembros que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, que también puede estar opcionalmente sustituido en la función N con un alquilo, |

alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, carboxilo, benciloxicarboxilo o hidroxilo,

$R^{11}$ representa un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, bencilo o fenilo,

$R^{12}$ y $R^{13}$ son idénticos o diferentes y representan hidrógeno, fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, o

$R^{3}$ y $R^{4}$ junto con el átomo de nitrógeno forman un heterociclo saturado, parcialmente saturado o insaturado de 5 ó 6 miembros que puede contener hasta 3 heteroátomos seleccionados de N, S y/o O o un residuo -$NR^{14}$, y que está opcionalmente sustituido con carbonilo, un alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono que a su vez puede estar sustituido con hidroxilo, carboxi o un acilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contienen respectivamente hasta 6 átomos de

[illegible] MORENO
[illegible] 13
[illegible] RID

carbono, en la que

$R^{14}$ representa hidrógeno, carbonilo o un alquilo ó alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 5 átomos de carbono, y

$R^5$ representa fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono,

A representa una cadena alquileno o alquenileno lineal o ramificada que contiene respectivamente hasta 6 átomos de carbono,

D y L son idénticos o diferentes y representan un arilo que contiene de 6 a 10 átomos de carbono o un heterociclo aromático de 5 a 7 miembros, opcionalmente benzocondensado, que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, opcionalmente sustituido hasta 3 veces con sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre halógeno, hidroxilo, nitro, trifluorometilo, carboxi, alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 6 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $-(V)_c-$

| | |
|---|---|
| | $NR^{15}R^{16}$ y/o $-OR^{17}$, en la que |
| c | es el número 0 ó 1, |
| V | representa un residuo de fórmula -CO o $-SO_2$, |
| $R^{15}$ y $R^{16}$ | son idénticos o diferentes y tienen el significado dado para $R^3$ y $R^4$ anteriormente, |
| $R^{17}$ | representa hidrógeno, un alquenilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono, opcionalmente sustituido hasta 3 veces con sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre hidroxilo, carbonilo o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, y/o los ciclos están opcionalmente sustituidos con un arilo que contiene de 6 a 10 átomos de carbono o con un heterociclo aromático de 5 a 7 miembros, opcionalmente condensado a benceno, que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, que está a su vez opcionalmente sustituido hasta dos veces con sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre halógeno, hidroxilo, nitro, carboxilo, |

PATRICIA ROSCH GARRIDO
ING. ... TRADUCTOR-INTÉRPRETE JURADO (?) ...
c. ... 13
Telf. ... - MADRID

| | |
|---|---|
| | trifluorometilo o un alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 5 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $(V')_d$-$NR^{18}R^{19}$, en la que |
| d | tiene el significado dado anteriormente para a y es idéntico a éste o diferente de éste, |
| $R^{18}$ y $R^{19}$ | tienen el significado dado anteriormente para $R^3$ y $R^4$ y son idénticos a éstos o diferentes de éstos, |
| V' | tiene el significado dado anteriormente para V y es idéntico a éste o diferente de éste, y/o |
| | representa el sistema de anillo dado a continuación para D, opcionalmente sustituido con un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con hidroxilo, un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $-NR^{20}R^{21}$, en la que |
| $R^{20}$ y $R^{21}$ | son idénticos o diferentes y tienen el significado dado anteriormente para $R^3$ y $R^4$, |
| | o |

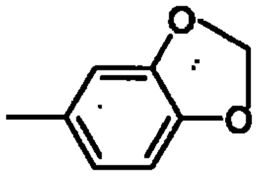
PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
c. [illegible] 13
Teléf. [illegible] MADRID

**E** representa un residuo de fórmula $-CH_2-Y-Z$, en la que

**Y** representa un enlace o un átomo de oxígeno o azufre o el grupo -NH-,

**Z** representa una cadena alquilo lineal o ramificada que contiene hasta 5 átomos de carbono,

**D** representa un residuo de fórmula

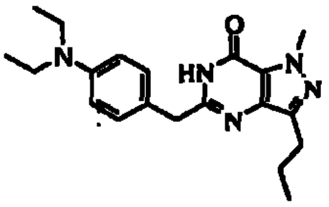
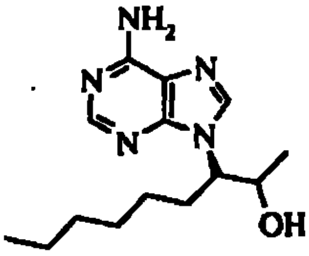
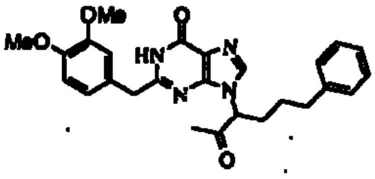
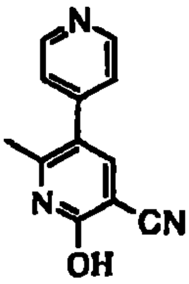


y tautómeros y sales de éste.

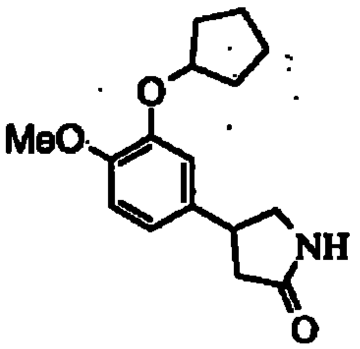
Los I:PDE preferidos se seleccionan de las siguientes estructuras:

| **Compuesto** | **Estructura** | **Modo de acción**<br>**Referencias** |
|---|---|---|

[illegible] MADRID

| | | |
|---|---|---|
| FIa |  | I:PDEI<br>EP-A-091133<br>(ejemplo 50) |
| FIb |  | I:PDE2<br>EHNA (también un inhibidor de adenosíndesaminasa) |
| FII |  | I:PDE2<br>EP-A-0771799<br>(ejemplo 100) |
| FIII |  | I:PDE3<br>Milrinona<br>(que está comercialmente disponible) |

MADRID

| | | |
|---|---|---|
| FIV |  | I:PDE4<br>Rolipram<br>(que está comercialmente disponible) |

NEP (endopeptidasa neutra)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es NEP.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de NEP están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En un aspecto, NEP es NEP (EC 3.4.24.11) (también conocida como encefalinasa o endopeptidasa-2). En este caso, se han encontrado mRNA de NEP EC 3.4.24.11 y proteína expresada en vagina humana y de conejo.

En este caso, creemos que en las hembras, incluyendo las

MORENO
MADRID

que sufren FSAD, se degrada el VIP por la NEP EC3.4.24.11. De esta manera, los inhibidores de NEP potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del VIP liberado durante la excitación. Esto conducirá a un tratamiento de los FSAD, tal como por medio de un aumento de la congestión vaginal. Se ha mostrado que los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 estimulan los aumentos del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo) estimulado por el nervio pélvico e inducidos por VIP. Además, esos inhibidores selectivos de NEP estimulan la relajación mediada por VIP y por los nervios de la pared vaginal aislada.

Las explicaciones de los antecedentes de NEP han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a NEP se ha extraído de esa fuente.

> "El antígeno de la leucemia linfocítica aguda común es un marcador de superficie celular importante en el diagnóstico de la leucemia linfocítica aguda humana (ALL). Está presente en células leucémicas de fenotipo pre-B, que representan el 85% de los casos de ALL. La CALLA no está restringido sin embargo a

las células leucémicas, y se encuentra en una serie de tejidos normales. La CALLA es una glicoproteína que es particularmente abundante en riñón, donde se presenta en el borde de cepillo de los túbulos proximales y en el epitelio glomerular. Letarte et el. (1988) clonaron un cDNA que codificaba CALLA y mostraron que la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de cDNA es idéntica a la de la endopeptidasa neutra humana asociada a membrana (NEP, EC 3.4.24.11), también conocida como encefalinasa. La NEP corta los péptidos en el extremo amino de los residuos hidrofóbicos e inactiva diversas hormonas peptídicas, incluyendo glucagón, encefalina, sustancia P, neurotensina, oxitocina y bradiquinina. Por análisis de transfección de cDNA, Shipp et al. (1989) confirmaron que CALLA es una endopeptidasa neutra funcional del tipo denominado anteriormente encefalinasa. Barker et al. (1989) demostraron que el gen CALLA, que codifica una glicoproteína transmembrana de tipo II de 100 kD, existe en una sola copia de más de 45 kD que no está reordenada como CALLA de superficie celular que expresa malignidades. Se localizó el gen en el cromosoma humano 3 por estudio de los híbridos celulares somáticos e hibridación in situ regionalizada en la

MORENO
MADRID

localización 3q21-q27. Tran-Paterson et al. (1989) asignaron también el gen al cromosoma 3 por análisis de transferencia Southern de DNA de híbridos celulares somáticos humano-roedor. D'Adamio et al. (1989) demostraron que el gen CALLA abarca más de 80 kb y está compuesto por 24 exones".

I:NEP

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:NEP.

Los aspectos amplios de este aspecto de la presente invención por lo tanto se refieren a:

a) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

b) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), siendo el

[illegible] 113 [illegible] MADRID

citado agente un I:NEP.

c) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el citado procedimiento el suministro a la hembra de un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

d) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

e) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente un I:NEP.

f) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD) o para prevenir FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento el

MADRID

1282

suministro a la hembra de un I:NEP.

Otros aspectos de la presente invención comprenden:

A) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

B) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, y siendo el citado agente un I:NEP.

C) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente

PATRICIA MORENO
MAN
MADRID
Telé.

farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

D) Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, y siendo el citado agente un I:NEP.

E) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

F) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente capaz de estimular

MORENO
IAN
113
MADRID
Telef.

la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra y siendo el citado agente un I:NEP.

G) Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de la hembra de modo que produzca un aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), y siendo el citado agente un I:NEP.

Los detalles de un sistema de ensayo adecuado para identificar y/o estudiar un I:NEP se presentan en la siguiente sección.

Los I:NEP se discuten en los siguientes artículos de revisión:

Pathol. Biol., 46(3), 1998, 191.
Curent Pharm. Design, 2(5), 1996, 443.
Biochem. Soc. Trans., 21(3), 1993, 678.
Handbook Exp. Pharmacol., 104/1, 1993, 547.
TiPS, 11, 1990, 245.
Pharmacol Rev., 45(1), 1993, 87.
Curr. Opin. Inves. Drugs, 2(11), 1993, 1175.
Antihypertens. Drugs, (1997), 113.

[illegible] 113
Telf. [illegible] - MADRID

Chemtracts, (1997), 10(11), 804.

Zinc Metalloproteases Health Dis. (1996), 105.

Cardiovasc. Drug. Rev., (1996), 14(2), 166.

Gen. Pharmacol., (1996), 27(4), 581.

Cardiovasc. Drug Rev., (1994), 12(4), 271.

Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., (1995), 22(1), 63.

Cardiovasc. Drug Rev., (1991), 9(3), 285.

Exp. Opin. Ther. Patents (1996), 6(11), 1147.

Se describen I:NEP en los siguientes documentos:

EP-509442A

US-192435

US-4929641

EP-599444B

US-884664

EP-544620A

US-798684

J. Med. Chem. 1993, 3821.

Circulation 1993, 88(4), 1.

EP-136883

JP-85136554

US-4722810

Curr. Pharm. Design, 1996, 2, 443.

EP-640594

[illegible] MORENO
[illegible] MADRID

J. Med. Chem. 1993, 36(1), 87.

EP-738711-A

JP-270957

CAS n° 115406-23-0

DE-19510566

DE-19638020

EP-830863

JP-98101565

EP-733642

WO9614293

JP-08245609

JP-96245609

WO9415908

JP05092948

WO-9309101

WO-9109840

EP-519738

EP-690070

J. Med. Chem. (1993), 36, 2420.

JP-95157459

Bioorg. Med. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65.

Los I:NEP preferidos se describen en los siguientes documentos:

MORENO
ALEMAN
113
MADRID

1287

EP-A-0274234

JP-88165353

Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, 164, 58

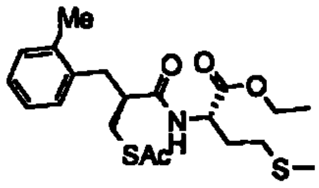
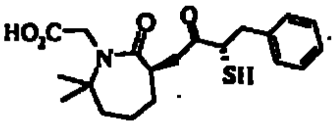
EP-629627-A

US-77978

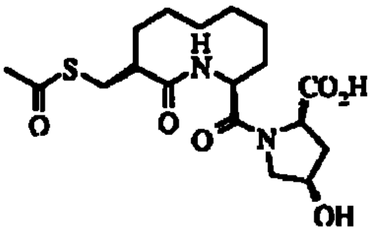
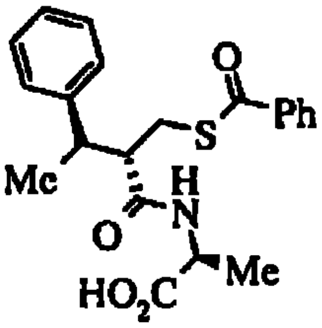
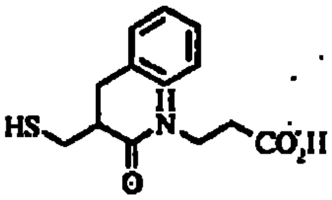
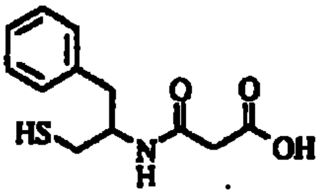
Perspect. Med. Chem. (1993), 45.

EP-358398-B

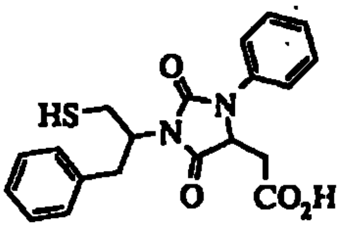
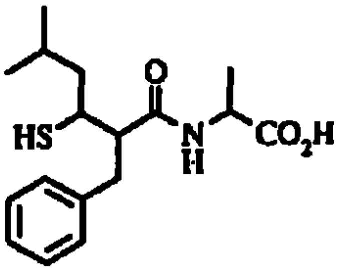
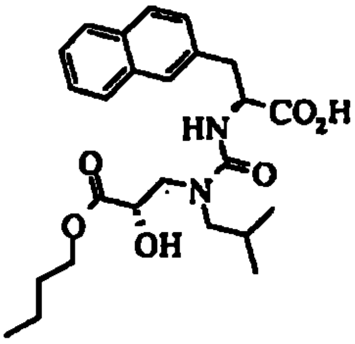
Los ejemplos preferidos de I:NEP se seleccionan de las siguientes estructuras:

| **Compuesto** | **Estructura** | **Modo de acción**<br>**Referencias** |
|---|---|---|
| FXII |  | I:NEP<br>EP-509442A<br>US-192435<br>US-4929641 |
| FXIII |  | I:NEP<br>(también inhibidor de ACE)<br>EP-599444B<br>US-884664 |

[illegible] MORENO
[illegible] ALEMAN
113
MADRID

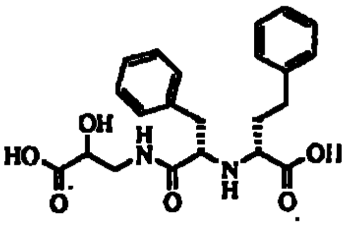
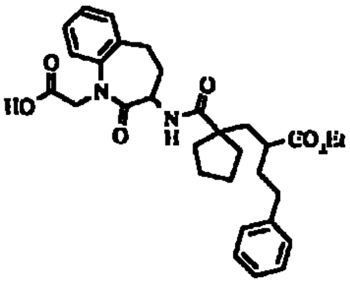
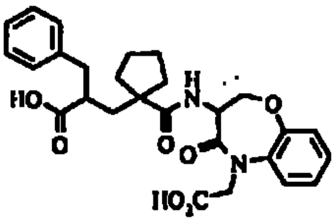
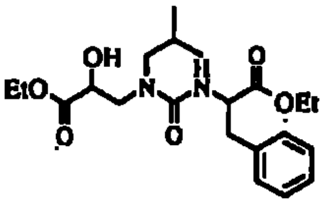
| | | |
|---|---|---|
| FXIV |  | I:NEP<br>EP-544620A<br>Us-798684<br>J. Med. Chem.<br>1993, 3821 |
| FXV |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>Mixanpril<br>Circulation 1993, 8(4), 1 |
| FXVI |  | I:NEP<br>EP-136883<br>JP-85136554<br>US-4722810 |
| FXVII |  | I:NEP<br>Retrothiorphan<br>Curr. Pharm. Design, 1996, 2, 443. |

PATRICIA KOCH MORENO
... ALEMAN
...gena, 113
... - MADRID

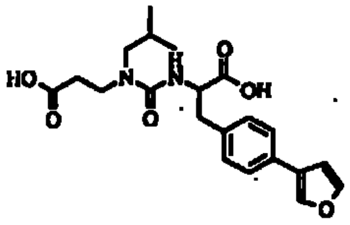
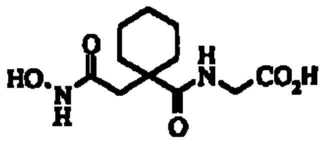
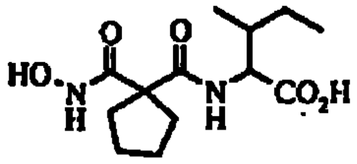
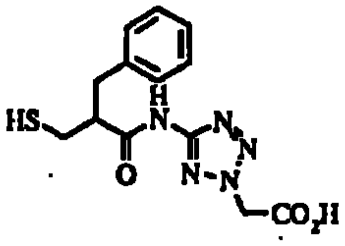
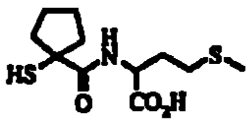
| | | |
|---|---|---|
| FXVIII |  | I:NEP<br>(también un<br>inhibidor de ACE)<br>EP-640594 |
| FXIX |  | I:NEP<br>J. Med. Chem.<br>1993, 36(1), 87 |
| FXX |  | I:NEP<br>(también un<br>inhibidor ACE)<br>EP-738711-A<br>JP-270957 |

MORENO
ING
RID
Tel

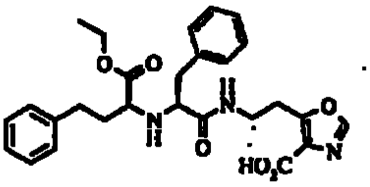
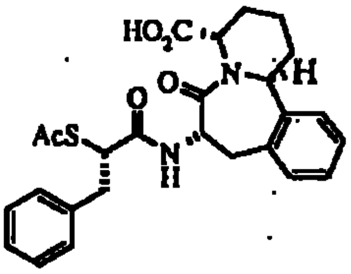
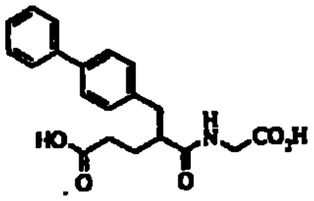
1290

| | | |
|---|---|---|
| FXXI |  | I:NEP<br>n° CAS 115406-23-0 |
| FXXII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>DE-19510566<br>DE-19638020<br>EP-830863<br>JP-98101565 |
| FXXIII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>EP-733642 |
| FXXIV |  | I:NEP<br>WO96/14293 |

[illegible] MORENO
[illegible] ALEMAN
[illegible] 113
Telf. [illegible] - MADRID

| | | |
|---|---|---|
| FXXV |  | I:NEP<br>JP-08245609<br>JP-96245609 |
| FXXVI |  | I:NEP<br>WO9415908 |
| FXXVII |  | I:NEP<br>JP5092948 |
| FXXVIII |  | I:NEP<br>WO-9309101 |
| FXXIX |  | I:NEP<br>WO-9109840 |

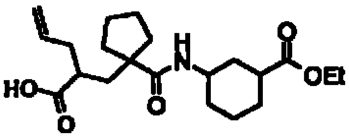
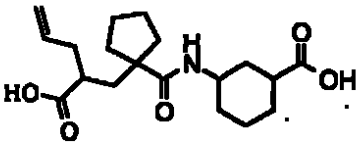
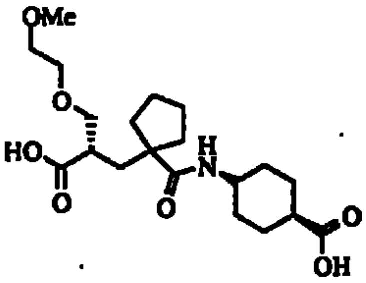
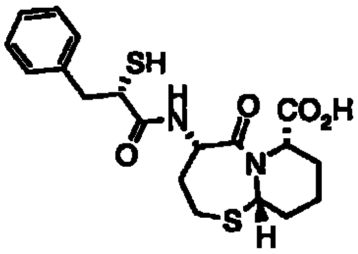
MADRID

| | | |
|---|---|---|
| FXXXI |  | I:NEP<br>EP-519738<br>EP-690070 |
| FXXXII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>J. Med. Chem. (1993), 36, 2420. |
| FXXXIII |  | I:NEP<br>JP-95157459<br>Bioorg. MEd. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65 |

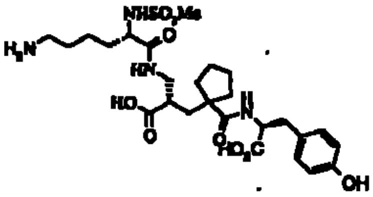
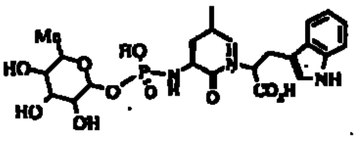
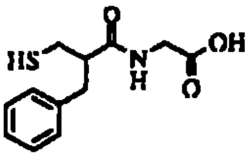
Los I:NEP más preferidos se seleccionan de las siguientes estructuras:

| Compuesto | Estructura | Modo de acción<br>Referencias |
|---|---|---|

PATRICIA KOEH MORENO
INGLÉS Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. [illegible] - MADRID

| | | |
|---|---|---|
| FV |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(ejemplo 300) |
| FVI |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(ejemplo 379) |
| FVII |  | I:NEP<br>Candoxatrilat<br>EP-274234<br>JP-88165353<br>Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, 164, 58. |
| FVIII |  | I:NEP<br>Omapatrilat<br>(también un inhibidor de ACE)<br>EP-0629627-A<br>US-77978 |

MORENO
LEMAN
113
MADRID
Teléf.

| | | |
|---|---|---|
| FIX |  | I:NEP<br>Sampatrilat<br>(también un inhibidor de ACE)<br>Perspect. Med. Chem. (1993), 45.<br>EP-0358398-B |
| FX |  | I:NEP<br>Fosforamidón<br>(que está comercialmente disponible) |
| FXI |  | I:NEP<br>Tiorfano<br>(que está comercialmente disponible) |

ENSAYO NEP

PREPARACION Y ENSAYO DE ENDOPEPTIDASA NEUTRA (NEP) SOLUBLE DE CORTEZA RENAL CANINA, DE RATA, DE CONEJO Y HUMANA.

Se obtiene la NEP soluble de corteza renal y se ensaya la

MADRID

1295

actividad midiendo de la tasa de ruptura del sustrato NEP Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp para generar su producto fluorescente Abz-D-Arg-Arg.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1. MATERIALES

Toda el agua se ha desionizado dos veces.

### 1.1. Tejidos

Riñón humano IIAM (Pennsylvania, EE.UU.)
Riñón de rata
Riñón de conejo
Riñón canino

### 1.2. Medio de homogeneización

Manitol 100 mM y Tris 20 mM a pH 7,1

2,42 g de Tris (Fisher T/P630/60) se diluyen en 1 litro de agua y se ajusta el pH a 7,1 utilizando HCl 6 M a temperatura ambiente. Se añade a ésto 18,22 g de manitol (Sigma M-9546).

### 1.3. Tampón tris (tampón NEP)

50 ml de Tris 50 mM a pH 7,4 (Sigma T2663) se diluyen en 950 ml de agua.

[illegible] MORENO
[illegible]
[illegible] MADRID

### 1.4. Sustrato (Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp)

Preparado por encargo en SNPE, almacenado en forma de polvo a -20°C. Se prepara una disolución madre 2 mM por resuspensión suave del sustrato en tampón Tris, éste no debe agitarse con vórtice ni sonicarse.

Se almacenan alícuotas de 600 µl de disolución madre 2 mM a -20 °C durante un periodo de hasta un mes (Medeiros, M.A.S., Franca, M.S.F. et al., (1997), Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 30, 1157-1162).

### 1.5. Producto total

Se incluyen en la placa muestras correspondientes a un 100% de conversión de sustrato a producto para posibilitar la determinación del % de producción del sustrato. Se genera el producto total por incubación de 1 ml de sustrato 2 mM con 20 µl de disolución madre de enzima durante 24 horas a 37°C.

### 1.6. Disolución de parada.

Se prepara una disolución madre 300 µM de fosforamidón (Sigma R7385) en tampón NEP y se almacena en alícuotas de 50 µl a -20°C.

### 1.7 Dimetilsulfóxido (DMSO)

MORENO
113
MADRID

1.8 Cloruro de magnesio, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Fisher M0600/53).

1.9 Placas de ensayo de fondo plano de 96 pocillos negras (Costar 3915).

1.10 Topseal A (Packard 6005185).

1.11. Tubos de centrífuga

## 2. EQUIPAMIENTO ESPECIFICO

2.1 Centrífuga Sorvall RC-5B (rotor SS34 GSA, preenfriada a 4°C).

2.2 mezclador Miniprimer Braun

2.3 Centrífuga Beckman CS-6R.

2.4 Fluostar galaxy

2.5 Incubador de agitación Wesbart 1589.

## 3. PROCEDIMIENTOS

### 3.1 PREPARACION DE TEJIDOS

3.2 Se obtienen NEP de perro, rata, conejo, y humana de corteza renal utilizando un procedimiento adaptado de Booth, A.G. & Kenny, A.J. (1974) *Biochem J.*, 142, 575-581.

3.3 Se dejan descongelar los riñones congelados a temperatura ambiente y se extraen las cortezas de la médula.

3.4 Se corta finamente en láminas la corteza y se homogeneiza en aproximadamente 10 volúmenes de tampón de

PATRICIA [illegible] MORENO
ING [illegible] LAMAN
[illegible] 13
Telf. [illegible] MADRID

homogeneización (1.2) utilizando un homogeneizador Braun (2.2).

3.5 Se añade cloruro de magnesio (1.8) (20,3 mg/g de tejido) al homogeneizado y se agita en baño de hielo durante 15 minutos.

3.6 Se centrifuga el homogeneizado a 1.500 g (3.820 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman (2.3) antes de extraer el sobrenadante a un tubo de centrífuga nuevo y descartar el sedimento.

3.7 Se centrifuga el sobrenadante a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Sorvall (2.1) y se descarta el sobrenadante.

3.8 Se extrae la capa rosa pálido de encima del sedimento restante y se resuspende en tampón de homogeneización que contiene cloruro de magnesio (9 mg de $MgCl_2$ en 5 ml de tampón por g de tejido).

3.9 Se centrifuga la suspensión a 2.200 g (4.630 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman (2.3) antes de descartar el sedimento.

3.10 Se centrifuga la suspensión a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos utilizando la centrífuga Sorvall (2.1) y se descarta el sobrenadante.

3.11 Se resuspende el sedimento final en tampón de homogeneización que contiene cloruro de magnesio (0,9 mg de $MgCl_2$ en 0,5 ml de tampón por g de tejido). Se obtiene

[illegible] MORENO
ING [illegible] Y [illegible]MAN
c [illegible] 113
Teléf. [illegible] - MADRID

una suspensión homogénea utilizando el mezclador Miniprimer Braun (2.2). Esta se congela a continuación en alícuotas de 100 µl para ensayar la actividad NEP.

## 4.0 DETERMINACION DE ACTIVIDAD NEP

Se mide la actividad de la NEP previamente dispuesta en alícuotas en función de su capacidad para cortar el sustrato peptídico específico de NEP.

4.1 Se prepara una disolución de DMSO al 4%/tampón NEP (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón NEP).

4.2 Se dejan las disoluciones madre de sustrato, producto total, enzima y fosforamidón en hielo para descongelar.

4.3 Se añaden 50 µl de disolución de DMSO al 4%/tampón NEP a cada pocillo.

4.4 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:40 para preparar una disolución 50 µM. Se añaden 100 µl de sustrato 50 µM a cada pocillo (concentración final 25 µM).

4.5 Se añaden 50 µl de un intervalo de diluciones de enzimas para iniciar la reacción (habitualmente se utilizan 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200). Se añaden 50 µl de tampón NEP a los pocillos blanco.

PATENTES [illegible] MORENO
INGL. [illegible] Y [illegible]AN
C. [illegible] 113
Telf. [illegible] - MADRID

4.6 Se diluye el producto total 2 mM 1:80 para preparar una disolución 25 $\mu$M. Se añaden 200 $\mu$l de producto 25 $\mu$M a los cuatro primeros pocillos de una placa nueva.

4.7 Se incuban las placas a 37°C en un incubador de agitación durante 60 minutos.

4.8 Se diluye la disolución madre 300 $\mu$M de fosforamidón 1:100 a 300 nM. Se para la reacción por adición de 100 $\mu$l de fosforamidón 300 nM y se incuba a 37°C en un incubador de agitación durante 20 minutos antes de leer en un Fluostar (ex320, em420).

## 5. ENSAYOS DE INHIBICION DE NEP

5.1 Se dejan las disoluciones madre de sustrato, producto total, enzima y fosforamidón en hielo para descongelar.

5.2 Se preparan disoluciones madre del compuesto con DMSO al 100% y se diluyen 1:25 en tampón NEP proporcionando una disolución de DMSO al 4%. Todas las demás diluciones se llevan a cabo en disolución de DMSO al 4% (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón NEP).

5.3 Se añaden 50 $\mu$l de compuesto por duplicado a la placa de 96 pocillos y se añaden 50 $\mu$l de DMSO al 4%/tampón NEP a los pocillos de control y a los pocillos blanco.

5.4 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM

MORENO MADRID

1:40 en tampón NEP preparando una disolución 50 µM (275 µl de sustrato 2 mM para 10,73 ml de tampón es suficiente para una placa).

5.5 Se diluye la disolución madre de enzima en tampón NEP (determinado por las comprobaciones de actividad).

5.6 Se diluye la disolución madre de producto total 2 mM 1:80 en tampón NEP para preparar una disolución 25 µM. Se añaden 200 µl a los primeros cuatro pocillos de una placa por separado.

5.7 Se diluye la disolución madre de fosforamidón 300 µM 1:1000 para preparar una disolución madre 300 nM (11 µl de fosforamidón para 10,99 ml de tampón NEP).

5.8 Se añade a cada pocillo de la placa de 96 pocillos lo siguiente:

Tabla de reactivos a añadir a la placa de 96 pocillos.

| | Compuesto /DMSO | Tampón Tris | Sustrato | Enzima NEP | Producto total |
|---|---|---|---|---|---|
| Muestras | 2 µl de compuesto | 50 µl | 100 µl | 50 µl | Nada |
| Controles | 2 µl de DMSO | 50 µl | 100 µl | 50 µl | Nada |

PATRICIA ... MORENO
... LEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 5199590 - MADRID

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Blancos | 2 µl de DMSO | 100 µl | 100 µl | Nada | Nada |
| Totales | 2 µl de DMSO | Nada | Nada | Nada | 200 µl |

5.9 Se inicia la reacción por adición de la enzima NEP antes de incubar a 37°C durante 1 hora en un incubador de agitación.

5.10 Se para la reacción con 100 µl de fosforamidón 300 nM y se incuba a 37°C durante 20 minutos en un incubador de agitación antes de leer en el Fluostar (ex320/em420).

## 6. CALCULOS

Se determina la actividad de la enzima NEP en presencia y en ausencia del compuesto y se expresa como un porcentaje.

% de actividad control (rendimiento de la enzima)

$$\frac{\text{FU medias de los controles - FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales - FU medias de los blancos}} \times 100$$

PATENTES [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. [illegible] - MADRID

% de actividad con inhibidor

$$\frac{\text{FU medias del compuesto - FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales - FU medias de los blancos}} \times 100$$

Actividad expresada como % del control:

$$\frac{\text{\% actividad con inhibidor}}{\text{\% actividad del control}} \times 100$$

Se ajusta una curva de dosis-respuesta sigmoidal para el % de actividades (% de control) frente a la concentración de compuesto y se calculan los valores de CI50 utilizando el ajuste de curvas LabStats en Excel.

NPY (neuropéptido Y)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es NPY o uno de sus receptores asociados.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de NPY y sus receptores están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan el listado de secuencias proporcionado en la presente.

PATENTES ... MORENO
INGENIEROS Y ... LIMAN
113
MADRID

En este caso, se ha encontrado que el neuropéptido Y (NPY) ejerce una influencia reguladora inhibidora sobre la vasorrelajación mediada por el péptido intestinal vasoactivo (VIP). De esta manera, la inhibición de los receptores NPY dará como resultado un aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo) mediado por el VIP y el nervio pélvico, es decir, anular las barreras a la vasorrelajación. Clínicamente, esto conducirá a un aumento de la congestión vaginal que conducirá en último término a un aumento de la lubricación a través de trasudación de plasma y a un aumento de la flexibilidad vaginal. Por ello, una diana adecuada para el tratamiento de los FSAD es NPY o uno de sus receptores asociados.

Así, en un aspecto preferido, el agente es un antagonista de NPY $Y_1$, $Y_2$ o $Y_5$, preferiblemente un antagonista oral de NPY $Y_1$, $Y_2$ o $Y_5$. Este agente tratará el FSAD aumentando el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo) y aumentando la lubricación.

El antagonismo mediado por NPY de los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo representa, por lo tanto, una diana terapéutica potencial mediante la cual el flujo sanguíneo en el tracto genital femenino puede ser

INGLÉS Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
MADRID

influenciado. El mecanismo a través del cual aparece este antagonismo es muy probablemente a través de activación $G_{i/o}$ inducida por el receptor NPY $Y_1$. En otros sistemas fisiológicos, los receptores NPY $Y_1$ han sido implicados en la mediación de la vasoconstricción y en la inhibición de la liberación de transmisores simpáticos (Lundberg et al., 1996, no puede excluirse un efecto de NPY $Y_2$). Se cree que el NPY inhibe la vasorrelajación en el tracto genital femenino mediante la inhibición directa de la adenilato ciclasa que inhibe directamente la liberación de VIP o la neurotransmisión simpática.

Como se ha indicado, un objetivo $P_{cAMP}$ es uno de los receptores NPY.

La liberación neuronal de NPY regula la vasorrelajación inducida por VIP del lecho vascular vaginal. Esto ocurre muy probablemente a través de un mecanismo presináptico que implica a los receptores NPY $Y_1$, aunque no puede excluirse un modo de acción post-sináptico. Un antagonista de NPY potenciará la vasodilatación inducida por VIP del lecho vascular vaginal. Clinicamente, esto conducirá a un aumento de la lubricación y de la flexibilidad vaginal a través de la congestión de la pared vaginal.

[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] MADRID

1306

Los estudios de expresión del receptor NPY realizados por los presente autores han identificado los subtipos de receptor NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$ dentro de la vagina humana.

Por ello, en un aspecto, la diana $P_{cAMP}$ es uno o más de los subtipos de receptores NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$.

Las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a NPY se ha extraído de esa fuente.

> "El neuropéptido Y (NPY) es un péptido abundante y ampliamente extendido en el sistema nervioso de los mamíferos. Muestra homología de secuencia con el péptido YY y por encima del 50% de homología en la secuencia de aminoácidos y en la secuencia de nucleótidos con el polipéptido pancreático (PNP, 167780). El NPY es un péptido de 36 aminoácidos. Minth et al. (1984) clonaron el gen de NPY partiendo de mRNA de feocromocitoma. Takeuchi et al. (1985, 1986) aislaron clones de cDNA de los genes NPY y PNP a partir de un feocromocitoma y un tumor endocrino

PATENTES [illegible] MORENO
ING [illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

pancreático, respectivamente. Utilizando estas sondas de cDNA para analizar el DNA genómico de paneles de asignación cromosómica de híbridos celulares somáticos humano-ratón, examinaron después la cuestión de si los genes son sinténicos. Los estudios no mostraron sintenia, con NPY en 7pter-7q22 y con PNP en 17p11.1-17qter. Por estudios de retrocruzamiento con Mus spretus, Bahary et al. (1991) mapearon el gen homólogo de NPY en el cromosoma 6 de ratón. Puesto que el cromosoma 6 tiene homología con el 7q humano, es probable que el gen NPY en humano esté localizado en la región 7cen-q22. Meisler et al. (1987) excluyeron ligamientos cercanos entre los loci de la fibrosis cística (219700) y el neuropéptido Y. Terenghi et al. (1987) determinaron la distribución del mRNA que codifica el NPY en neuronas de la corteza cerebral en especímenes de biopsia quirúrgica y cerebro postmortem por medio de técnicas de hibridación in situ. Mostraron una localización consistente de la transcripción y expresión del gen NPY en neuronas corticales maduras normales. Baker et al. (1995) mostró por fluorescencia de hibridación in situ que el gen NPY está localizado en 7p15.1 y que existe en una sola copia. Comentaron que el NPY es uno de los péptidos

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] MADRID

más conservados conocidos con, por ejemplo, sólo 3 aminoácidos de diferencia entre humano y tiburón. El neuropéptido Y es un neuromodulador implicado en el control del equilibrio de energía y se sobreproduce en el hipotálamo de ratones ob/ob. Para determinar el papel de NPY en la respuesta a la deficiencia de leptina (164160), Erickson et al. (1996) generaron ratones ob/ob deficientes en NPY. En ausencia de NPY, los ratones ob/ob eran menos obesos debido a una menor ingestión de alimento y un mayor gasto de energía, y estaban afectados con una menor gravedad por diabetes, esterilidad y defectos somatrópicos. Estos resultados se interpretaron como indicadores de que NPY es un efector central de la deficiencia de leptina. Los análisis de ligamiento genético de ratas que se criaron selectivamente para mostrar una preferencia por el alcohol, identificaron una región cromosómica que incluía el gen NPY (Carr et al., 1998). Las ratas que prefieren alcohol tuvieron niveles menores de NPY en diversas regiones cerebrales comparadas con las ratas que no prefieren alcohol. Thiele et al. (1998) estudiaron por lo tanto el consumo de alcohol en ratones que carecían completamente de NPY como resultado de una alteración dirigida del gen (Erickson et al., 1996). Encontraron

PATRICIA NOCK MORENO
113
MADRID

que los ratones deficientes en NPY mostraban un aumento del consumo, comparado con las ratones de tipo silvestre, de disoluciones que contenían etanol al 6%, 10% y 20% (en volumen). Los ratones deficientes en NPY eran también menos sensibles a los efectos sedantes/hipnóticos del etanol, como mostró una recuperación más rápida del sueño inducido por etanol, incluso aunque los niveles de etanol en plasma no diferían significativamente de los de los controles. En contraposición, los ratones transgénicos que sobreexpresaron un gen NPY marcado en neuronas que habitualmente lo expresan, tuvieron una menor preferencia por el alcohol y fueron más sensibles a los efectos sedantes/hipnóticos del etanol que los controles. Estos datos proporcionaron evidencias directas de que el consumo de alcohol y la resistencia son inversamente proporcionales a los niveles de NPY en el cerebro. Como parte de un estudio en marcha sobre la base genética de la obesidad, Karvonen et al. (1998) identificaron un polimorfismo 1128T-C que resultaba de la sustitución de leucina por prolina en el residuo 7 de la parte péptido señal de pre-pro-NPY. Este polimorfismo no estaba asociado a la obesidad o al metabolismo energético, pero estaba significativa y

PATRICIA KOSH MORENO
INGL... Y ALEMAN
... 113
... MADRID

1310

consistentemente asociado a altos niveles de colesterol total y colesterol LDL en suero tanto en sujetos finlandeses de peso normal y obesos como en holandeses obesos. Uusitupa et al. (1998) encontró el polimorfismo pro7 en el 14% de los finlandeses, pero sólo en el 6% de los holandeses. Los sujetos con pro7 en NPY tenían, de media, niveles de colesterol total en suero de 0,6 a 1,14 mmol/l mayores que aquellos sin esta variante del gen. Puesto que el impacto de pro7 NPY sobre los niveles de colesterol en suero no pudieron encontrarse en holandeses de peso normal, puede suponerse que las personas obesas son más susceptibles al efecto de la variante del gen. Se calculó que la probabilidad de tener el pro7 en NPY podría ser del orden del 50 o del 60% en sujetos obesos con un colesterol total en suero igual o superior a 8 mmol/l. Al menos entre los finlandeses, la forma pro7 de NPY es uno de los factores genéticos más potentes que afectan a los niveles de colesterol en suero. Véase también Allen y Bloom (1986), Dockray (1986), Maccarrone y Jarrott (1986), Minth et al. (1986)".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido preparadas

PATRICIA ... MORENO ... MADRID

por Victor A: McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a NPYR1 se ha extraido de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY, 162640) es uno de los neuropéptidos más abundantes en el sistema nervioso mamífero y exhibe un variado intervalo de actividades fisiológicas importantes, incluyendo efectos sobre la actividad psicomotriz, ingestión de alimento, regulación de la secreción endocrina central y potentes efectos vasoactivos sobre el sistema cardiovascular. Se han definido dos grandes subtipos de NPY (Y1 e Y2) por criterios farmacólogicos. Los receptores NPY Y1 se han identificado en una serie de tejidos, incluyendo cerebro, bazo, intestino delgado, riñón, testículos, placenta y músculo liso aórtico. El receptor Y2 se encuentra principalmente en el sistema nervioso central. Herzog et al. (1992) informaron de haber clonado un cDNA que codificaba un receptor de NPY humano del que confirmaron que era un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G. Cuando se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón embrionario humano, el receptor exhibió características de especificidad de ligando. En la línea celular de riñón, el receptor se acopló a una proteína G

[illegible] MORENO [illegible] MADRID

sensible a la toxina pertussis que mediaba la inhibición de la acumulación de AMP cíclico. En la línea celular CHO, por otro lado, el receptor no se acopló a la inhibición de la adenilato ciclasa, sino a la elevación del calcio intracelular. De esta manera, el acoplamiento de segundo mensajero del receptor NPY era específico del tipo celular, dependiendo del repertorio específico de proteínas G y de sistemas efectores presentes en el tipo de célula. Larhammar et al. (1992) clonaron independientemente y caracterizaron el receptor de neuropéptido Y. Herzog et al. (1993) determinaron la organización molecular y la regulación del gen del receptor de NPY Y1. En contraposición con la estructura contigua de la mayoría de los genes del receptor acoplados a proteína G, encontraron que el gen del receptor de NPY Y1 tiene 3 exones. Identificaron también un polimorfismo Pstl común en el primer intrón del gen. Por hibridación in situ con fluorescencia de alta resolución, localizaron el gen en 4q31.3-q32. Herzog et al. (1997) encontraron que los genes NPY1R y NPY5R (602001) están localizados conjuntamente en el cromosoma 4q31-q32. Los dos genes se transcriben en direcciones opuestas a partir de una región promotora común. Uno de los exones 5'

MORENO
13
ADRID
Telé

alternativamente ligados al gen del receptor Y1 es una parte de la secuencia de codificación del receptor Y5. Esta infrecuente reordenación sugirió a Herzog et al. (1997) que los 2 genes surgieron por un fenómeno de duplicación del gen y que pueden expresarse coordinadamente. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Lutz et al. (1997) mapearon los genes Npy1r y Npy2r en grupos de ligamiento conservado en los cromosomas 8 y 3 de ratón, respectivamente, que corresponden con la región distal del cromosoma humano 4q".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibid.). El siguiente texto referente a NPYR2 se ha extraído de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY) señala una familia de receptores acoplados a la proteína G presente en el cerebro y en neuronas simpáticas. Se han definido al menos 3 subtipos de receptor de neuropéptido Y sobre la base de criteria farmacológicos, distribución en tejido y estructura del gen de codificación, véanse 162641 y 162643. Rose et al. (1995) informaron de la clonación de expresión en células COS de un cDNA para el receptor tipo 2 humano, NPY2R. Las células transfectadas mostraron una alta afinidad por NPY (162640), el péptido YY (PYY, 600781) y un fragmento de NPY que incluía los aminoácidos 13 a 36. La proteína de 381 aminoácidos prevista tiene 7 dominios transmembrana característicos de los receptores acoplados a la proteína G y es sólo un 31% idéntica al receptor Y1 humano (NPY1R, 162641). Se detectó un mRNA de 4 kb por transferencia Northern de muestras de tejido de diversas regiones del sistema nervioso. Gerald et al. (1995) clonaron el cDNA correspondiente al receptor Y2 de una biblioteca de expresión de cDNA de hipocampo humano utilizando un ensayo de unión de PYY marcado con radioisótopos. Expresaron el gen Y2 en células COS-7 y realizaron un ensayo de unión a hormona que mostró que el receptor Y2 se une (de mayor a menor afinidad) a las hormonas PYY, NPY y polipéptido pancreático (PP, 167780). Ammar et al. (1996) clonaron y caracterizaron el gen humano que codifica el receptor NPY de tipo 2. La copia abarca 9 kb de secuencia genómica y está codificada en 2 exones. Como en el gen de receptor NPY de tipo 1, la región no traducida de 5' de NPY2R está interrumpida por una secuencia intermedia de 4,5 kb. Ammar et al. (1996) demostraron por análisis Southern de híbridos

> celulares roedor-humano seguido de hibridación in situ con fluorescencia (*FISH*) que el gen NPY2R se mapea en 4q31, la misma región que contiene el gen NPY1R, sugiriendo que estos subtipos pueden haber surgido de la duplicación del gen a pesar de sus diferencias estructurales. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Lutz et al. (1997) mapearon los genes Npy1r y Npy2r en grupos de ligamiento conservado en los cromosomas 8 y 3 de ratón, respectivamente, que corresponden a la región distal del cromosoma humano 4q".

Se presenta un ensayo para determinar si un agente supuesto o real según la presente invención puede unirse a NPY en el documento WO-A-98/52890 (véase la página 96 de éste, líneas 2 a 28).

I:NPY

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:NPY (a veces denominado antagonista de NPY).

Los aspectos amplios de este aspecto de la presente invención se refieren por lo tanto a:

a) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

b) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), siendo el citado agente un I:NPY.

c) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el citado procedimiento el suministro a la hembra de un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

d) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado

MORENO
MADRID

1317

agente un I:NPY.

e) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente un I:NPY.

f) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD) o para prevenir FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un I:NPY.

Otros aspectos de la presente invención comprenden:

A) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

B) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar

PATRICIA ... MORENO
ING ... AN
... 13
... ADRID

el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, y siendo el citado agente un I:NPY.

C) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

D) Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, y siendo el citado agente un I:NPY.

E) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

F) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra y siendo el citado agente un I:NPY.

G) Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de la hembra de modo que produzca un flujo sanguíneo genital aumentado (por ejemplo vaginal o clitorídeo), y siendo el citado agente un I:NPY.

Se discuten I:NPY (en particular antagonistas de NPY) en los siguientes artículos de revisión:

Dunlop J., Rosenzweig-Lipson, S.: Therapeutic approaches to obesity, Exp. Opin. Ther. Pat. 1999, 8, 12, 1683-1694.

Wang S., Ferguson K.C., Burris T.P., Dhurandhar N.V.: 8th annual international conference on obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus: novel drug developments. Exp. Opin. Invest. Drugs 1999, 8, 7, 117-1125.

Ling A.L.: Neuropeptide Y receptor antagonists. Exp. Opin. Ther. Pat. 1999, 9, 4, 375-384. Adham N., Tamm J., Du P., Hou C., et al: Identification of residues involved in the binding of the antagonist SNAP 6608 to the Y5 receptor. Soc. Neurosci.Abstr. 1998, 24, parte 2, 626.9.

Shu Y.Z., Cutrone J.Q., Klohr S.E., Huang S.: BMS-192548, a tetracyclic binding inhibitor of neuropeptide Y receptors, from Aspergillus niger. WB2346. II. Physico-chemical properties and structural characterization. J. Antibiot. 1995, 48, 10, 1060-1065.

Rigollier P. Rueger H., Whitebread S., Yamaguchi Y., Chiesi M., Schilling W., Criscione L.: Synthesis and SAR of CGP 71683A, a potent and selective antagonist of the neuropeptide Y Y5 receptor. Int. Symp. Med. Chem., 1998, 15th Edinburgo, 239.

Criscione L., Rigollier P., Batzl-Hartmann C., Rueger H., Stricker-Krongrad A., et al: Food Intake in free-feeding

PATRICIA HIGH MORENO

and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. J. Clin. Invest. 1998, 102, 12, 2136-2145.

Neurogen Corp: NGD 95-1. Clin. Trials Monitor. 1996, 5, 10, Ab 19244.

Buttle L.A.: Anti-obesity drugs: on target for huge market sales. Exp. Opin. Invest. Drugs 1996, 5, 12, 1583-1587.

Gehlert D.R., Hipskind, P.A.: Neuropeptide Y receptor antagonists in obesity. Exp. Opin. Invest. Drugs, 1996, 7, 9, 1827-1838.

Goldstein D.J., Trautmann M.E.: Treatments for obesity. Emerging Drugs, 1997, 2-1-27.

Hipskind P.A., Lobb K.L., Nixon J.A., Britton T.C., Bruns R.F., Catlow J., Dieckman McGinty D.K., Gackenheimer S.L., Gitter B.D., Iyengar S., Schober D.A. et al: Potent and selective 1,2,3-trisubstituted indole NPY Y-1 antagonists. J. Med. Chem. 1997, 40, 3712-3714.

Zimmerman D.M., Cantrall B.E., Smith E.C.R., Nixon J.A., Bruns R.F., Gitter B., Hipskind P.A., Ornstein P.L.,

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
[illegible]
[illegible]DRID
Telf. [illegible]

Zarrinmayeh H., Britton T.C., Schober D.A., Gehlert D.R.: Structure-activity relationships of a series of 1-substituted-4-methilbenzimidazole neuropeptide Y-1 receptor antagonists. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1998, 8, 5, 473-476.

Zarrinmayeh H., Nunes A., Ornstein P., Zimmerman D., Arnold M.B., et al.: Synthesis and evaluation of a series of novel 2-[(4-chlorophenoxy)methyl]benzimidazoles as selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. J. Med. Chem. 1998, 41, 15, 2709-2719.

Britton T.C., Spinazze P.G., Hipskind P.A., Zimmerman D.M., Zarrinmayeh, H., Schober D.A., Gehlert D.R., Bruns R.F.: Structure-activity relationships of a series of benzotiophene-derived NPY-Y1 antagonists: optimization of the C2 side chain. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1999, 3, 475-480.

Zarrinmayeh H., Zimmerman D.M., Cantrell B.E., Schober D.A., Bruns R.F., Gakenheimer S.L., Ornstein P.L., Hipskind P.A., Britton T.C., Gehlert D.R.: Structure-activity relationship of a series of diaminoalkyl substituted benzimidazole as neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. Bioorganic, Med. Chem. Lett. 1999, 5, 647-652.

MORENO

Murakami Y., Hara H., Okada T., Hashizume S., Kii, M., Ishihara, Y., Ishikawa, M., Mihara, S-I., Kato, G., Hanasaki, K., Hagishita, S., Fujimoto M.: 1,3-disubstituted benzazepines as novel, potent, selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. J. Med. Chem. 1999, 42, 14, 2621-2632.

Rudolf K., Eberlein W., Engel W., Wieland H.A., Willim K.D., Entzeroth M., Wienen W., Beck Sickinger A.G., Doods, H.N.: The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur. J. Pharmacol. 1994, 271, 2-3, R11-R13.

Wieland H.A., Willim K.D:, Entzeroth M., Wienen W., Rudolf K., Eberlein W. Engel W., Doods H.N.: Subtype selectivity and antagonist profile of the nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1995, 275, 1, 143-149.

Wright J., Bolton G., Creswell M., Downing D., Georgic L., Heffner T., Hodges J., MacKenzie R., Wise L.: 8-amino-6-(arylsulphonyl)-5-nitroquinolones: novel nonpeptide neuropetide Y1 receptor antagonists. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1996, 6, 15, 1809-1814.

[illegible] MAGRENO [illegible] MADRID

Capurro D., Huidobro-Toro J.P.: The involvements of neuropeptide Y Yi receptors in the blood pressure baroreflex: studies with BIBP 3226 and BIB 3304. Eur. J. Pharmacol. 1999, 376, 3, 251-255.

Dumont Y., Cadieux A., Doods H., Quirion R.: New tools to investigate neuropeptide Y receptors in the central and peripheral nervous systems: BIBO-3304 (Y1), BIIE-246 (Y2) y [125I]-GR-231118 (Y1/Y4). Soc. Neurosci. Abstr. 1999, 25, parte 1, Aptdo. 74.11.

Hedge S.S., Bonhaus D.W., Stanley W., Eglen R.M., Moy T.M., Loeb M., et al.: Pharmacological evaluation of 1229U91, a high affinity and selective neuropeptide Y(NPY)-Y1 receptor antagonist. Pharmacol. Res. 1995, 31, 190.

Matthews J.E., Chance W.T., Grizzle M.K., Heyer D., Daniels A.J.: Food intake inhibition and body weight loss in rats treated with GI 264879A, an NPY-Y1 receptor. Soc. Neurosci. Abstr. 1997, 23, parte 2, 1346.

Doods H.N., Willim K-D., Smith S.J.: BIBP 3226: a selective and highly potent NPY-Y1 antagonist. Proc. Br. Pharmacol. Soc. 1994, 13-16, Dec. C47.

[illegible] MORENO [illegible] MAN [illegible] 113 [illegible] ADRID

Rudolf K., Eberlein, W., Engel W., Wieland H.A., Willim K.D., Entzeroth M., Wienen W., Beck Sickinger A.G., Doods H.N.: The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur. J. Pharmacol. 1994, 271, 2-3, R11-R13.

Serradelil-Le-Gal C., Valette G., Rouby P.E., Pellet A., Villanova G., Foulon L., Lespy L., Neliat G., Chambon J.P., Maffrand J.P., Le-Fur G.: SR 120107A y SR 120819A: Two potent and selective, orally-effective antagonists for NPY Y1 receptors. Soc. Neurosci. Abstr. 1994, 20, parte 1, 907, Aptdo. 376.14.

Hong Y., Gregor V., Ling A.L., Tompkins E.V., Porter J. Chou T.S., Paderes G., Peng Z., Hagaman C., Anderes K., Luthin D., May J.: Synthesis and biological evaluation of novel guanylurea compounds as potent NPY Y1 receptor antagonist. Acs 1999, 217, Anaheim MEDI 108.

Se describen I:NPY (en particular antagonistas de NPY) en los siguientes documentos:

WO-98/07420
WO-94/00486
WO-96/22305

PAT... MORENO
...MADRID

WO-97/20821

WO-97/20822

WO-96/14307

JP-07267988

WO-96/12489

US-5552422

WO-98/35957

WO-96/14307

WO-94/17035

EP-0614911

WO-98/40356

EP-0448765

EP-0747356

WO-98/35941

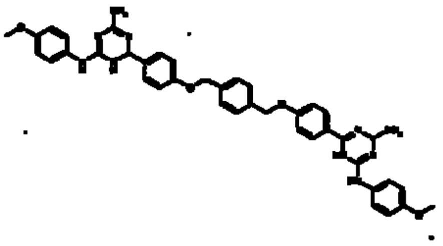
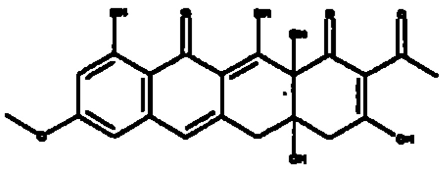
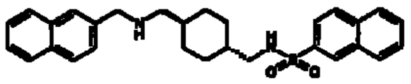
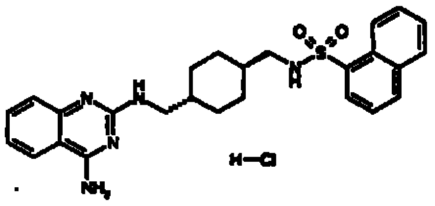
WO-97/46250

EP-0747357

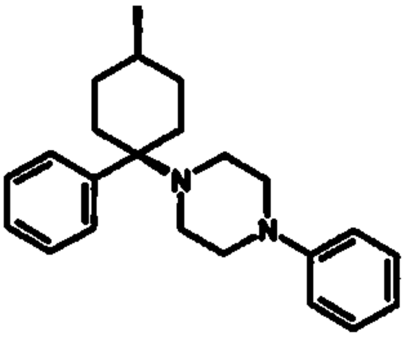
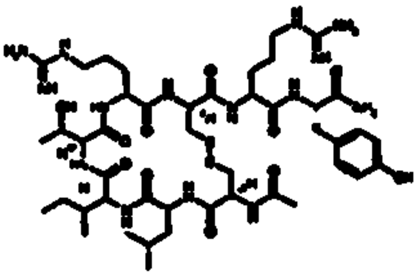
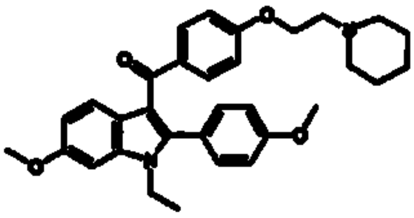
Los ejemplos preferidos de I:NPY se seleccionan de las siguientes estructuras. Estos compuestos se ensayaron como agentes según la presente invención y se encontraron útiles para potenciar el cAMP, siendo por ello útiles en el tratamiento de FSAD. Algunos de los datos experimentales referentes a estos compuestos se presentan en la sección experimental (a continuación).

MORENO
ALEMAN
113
MADRID

1327 ~~1330~~

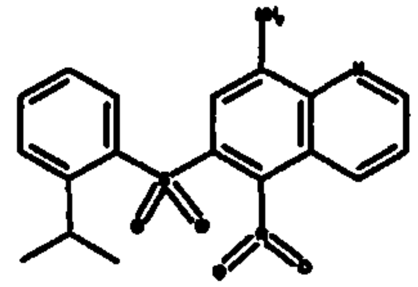
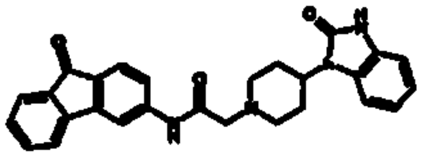
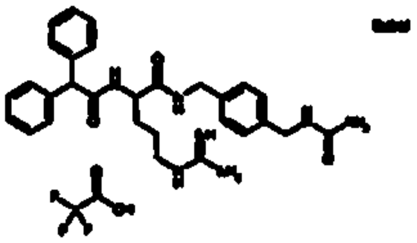
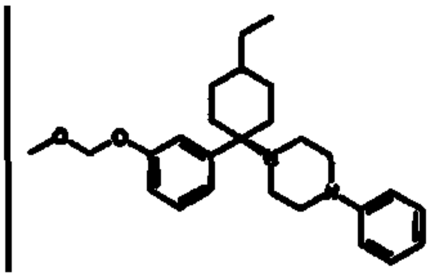
| Compuesto | Estructura | Modo de acción<br>Referencias |
|---|---|---|
| F34 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/07420<br>Ref. 3 |
| F35 |  | I:NPY<br>Ref. 5 |
| F36 |  | I:NPY Y5<br>Ref 1,4 |
| F37 | dímero (2,2'),(4,4')-disulfuro cíclico Ile-Cys-Pro-Cys-Tyr-Arg-Leu-Arg-Tyr-NH2 | I:NPY Y1<br>WO-94/00486<br>WO-96/22305<br>Ref. 1, 2, 23 |
| F38 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/20821<br>WO-97/20822<br>Ref. 1, 3, 6, 7 |

MADRID

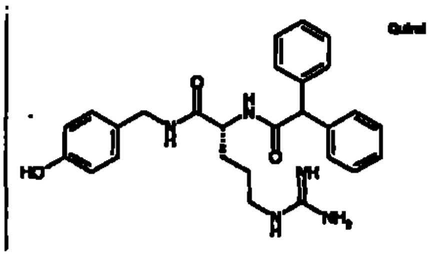
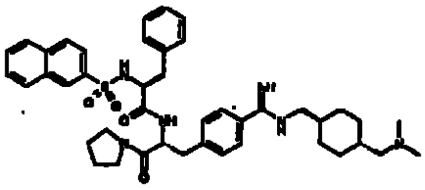
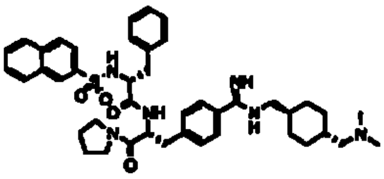
| | | |
|---|---|---|
| F39 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref. 1, 8, 9, 10, 11 |
| F40 |  | I·NPY Y1<br>JP-07267988<br>Ref. 1 |
| F41 |  | I.NPY Y1<br>WO-96/12489<br>Ref. 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |

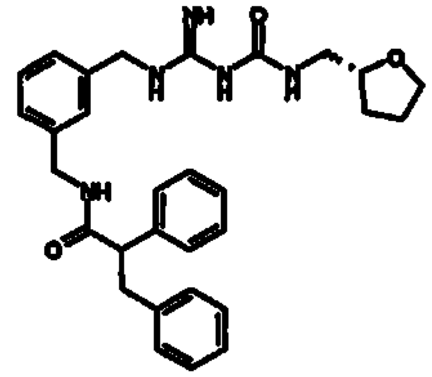
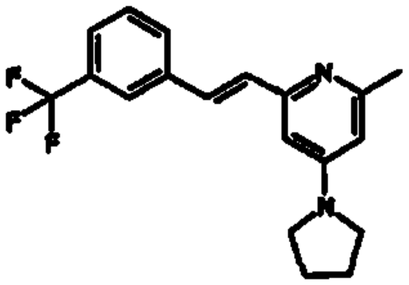
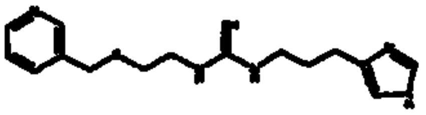
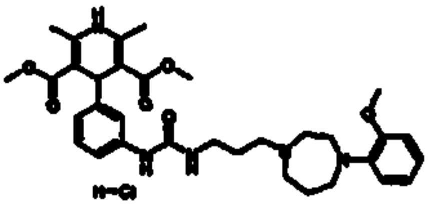
EMO
AN
AS
ADRID

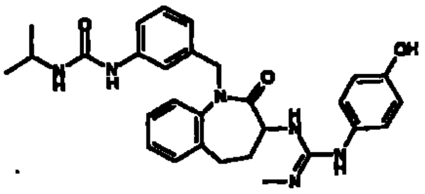
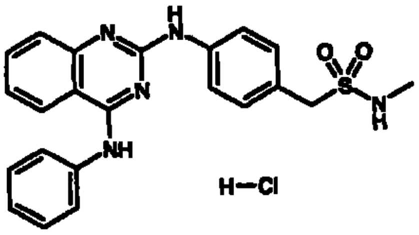
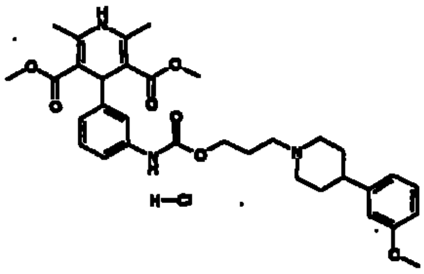
1329 ~~1392~~

| | | |
|---|---|---|
| F42 |  | I·NPY Y1<br>US-5552422<br>Ref. 17, 18, 19, 20 |
| F43 |  | I.NPY Y5<br>WO-98/35957<br>Ref 3 |
| F44 |  | I·NPY Y1<br>Ref 21, 22 |
| F45 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref. 3 |

MORENO
MAN
13
RID

| | | |
|---|---|---|
| F46 | Para la fórmula véase la referencia | I:NPY Y1<br>Ref. 24 |
| F47a |  | I:NPY Y1<br>WO-94/17035<br>Ref. 3, 17, 15, 26 |
| F47b | Para la fórmula véase la referencia | I:NPY Y1<br>Ref. 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |
| F48 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref. 27 |
| F49 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27. |

| | | |
|---|---|---|
| F50 |  | I.NPY Y1<br>Ref. 28 |
| F51 |  | I NPY Y5<br>WO-98/40356 |
| F52 |  | I NPY<br>EP-0448765 |
| F53 |  | I NPY Y1<br>EP-0747356 |

| | | |
|---|---|---|
| F54 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/35941 |
| F55 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/46250 |
| F56 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747357 |

VIP (péptido intestinal vasoactivo)

Según un aspecto de la presente invención, una diana de $P_{cAMP}$ es VIP o uno de sus receptores asociados. La clasificación/nomenclatura actual se refiere a estos como VPAC1, VPAC2 y PACAP.

MADRID

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos para VIP y sus receptores están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

Hemos mostrado que VPAC1 y VPAC2 están presentes en la vagina humana y en la de conejo. PACAP estaba ausente tanto en la vagina de conejo como humana.

VIP es un importante neurotransmisor endógeno liberado durante la excitación sexual que es responsable de la vasodilatación vaginal inducida por el nervio del lecho vascular localizado en la pared vaginal. Estos efectos vasodilatadores están mediados por la activación de adenilato ciclasa y la producción de cAMP. Sin pretender limitarse a la teoría, este efecto puede estar mediado a través de receptores de VIP subtipos VPAC$_1$, VPAC$_2$ o PACAP (péptido activador de la adenilato ciclasa en la pituitaria). Los receptores VPAC$_2$ y PACAP son los más ampliamente extendidos en el SNC y estos receptores, a pesar de expresarse en la pituitaria, parecen no tener una función biológica extendida.

El agente de la presente invención podría potenciar el VIP y/o actuar como un mimético o análogo de éste. El agente

Y ALEMAN
113
MADRID

potenciaría entonces y/o imitaría los efectos vasorrelajantes del VIP endógeno liberado durante la excitación sexual. El agente puede tener también un efecto aditivo sobre la relajación del músculo liso vaginal inducida por VIP. Clínicamente, esto conducirá al tratamiento de los FSAD mediante el aumento de la lubricación vaginal a través de la congestión y flexibilidad de la pared vaginal. En esta realización, el mimético o análogo no tendría, sin embargo, las propiedades adversas de VIP como se han discutido anteriormente.

Las explicaciones de los antecedentes sobre VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente al VIP se ha extraído de esa fuente.

> "El péptido intestinal vasoactivo (VIP), un péptido de 28 aminoácios aislado originalmente de duodeno porcino, está presente no sólo en tejidos gastrointestinales sino también en tejidos neuronales, posiblemente como neurotransmisor, y exhibe una amplia variedad de acciones biológicas. Debido a que el VIP muestra similitudes con el

glucagón, la secretina y el péptido inhibitorio gástrico (GIP), se ha considerado un miembro de la familia de glucagón-secretina. El producto primario de traducción del mRNA que codifica el VIP (prepro-VIP) tiene un peso molecular de 20 dalton. Por clonación de la secuencia de DNA complementaria al mRNA que codifica el VIP humano, Itoh et al. (1983) encontraron que el precursor de VIP contiene no sólo el VIP sino también un nuevo péptido de 27 aminoácidos, designado como PHM27, que tiene histidina aminoterminal y metionina carboxiterminal. Difiere del PHI17 aislado de intestino porcino en 2 aminoácidos, el PHI27, como su designación indica, tiene isoleucina carboxiterminal. Linder et al. (1987) aislaron el gen humano de VIP y PHM27 y estudiaron su expresión en diversos tejidos de rata. Heinz-Erian et al. (1985) sugirieron que la deficiente innovación de las glandulas sudoríparas de los pacientes con fibrosis quística por el neuropéptido VIP podría ser un mecanismo básico de reducción del contenido de agua y de impermeabilidad relativa del epitelio al cloruro y a otros iones que caracteriza a la fibrosis quística. Para comprobar esta hipótesis, Gozes et al. (1987) adoptaron el enfoque de "gen candidato". Bodner et al. (1985)

MORENO
113
MADRID

habían mostrado que el VIP y el PHM-27 están codificados por exones adyacentes. Gozes et al. (1985) utilizaron el fragmento genómico de codificación de PHM-27 para detectar la presencia del gen VIP en 6q21-qter. De esta manera, eliminaron un gen defectivo de VIP como candidato a causa primaria de fibrosis quística (que está codificada en el cromosoma 7). Por técnicas de hibridación in situ, Gozes et al. (1987) asignaron el gen VIP a 6q24. Esto colocó a VIP en la región de MYB (189990), que se ha mapeado en 6q22. Gozes et al. (1987) investigaron una relación funcional entre los 2 genes en tejido neuronal. Observaron un pico agudo de mRNA de MYB en el hipocampo de ratas de 3 días de edad, antes del pico de mRNA de VIP que aparece en este área a los 8 días de edad. Omary y Kagnoff (1987) encontraron receptores nucleares para el VIP en una línea celular de adenocarcinoma colónico humano. Gotoh et al. (1988) asignaron el VIP al cromosoma 6 por hibridación de transferencia de manchas de un fragmento clonado molecularmente del gen a cromosomas clasificados. La localización se refinó a 6q26-q27 por hibridación in situ".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes

[illegible] 13 MADRID

1337

sobre el VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a VIPR1 o VPAC1 se ha extraido de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP, 192320) es un mediador neuroendocrino octacosamérico encontrado principalmente en neuronas presinápticas colinérgicas del sistema nervioso central y en neuronas peptidérgicas periféricas que inervan diversos tejidos. De los muchos pétidos neuroendocrinos con funciones inmunológicas, el VIP se distingue por su capacidad de afectar tanto a células B como a células T directamente. Los distintos subconjuntos de células neuronales, respiratorias, gastrointestinales e inmunes llevan receptores de alta afinidad específicos de VIP, que están asociados con una proteína de unión al nucleótido guanina (G) capaz de activar la adenilato ciclasa. Libert et al., (1991) obtuvieron 4 nuevos receptores de la familia de receptores acoplados a la proteína G por amplificación selectiva y clonación de cDNA tiroide. Uno de ellos, RDC1, fue identificado como el receptor de VIP por Sreedharan et al (1991). Libert et al. (1991) mapearon el gen VIPR en 2q37 por hibridación in situ. Informaciones posteriores hicieron dudoso

PATRICIA ... MORENO
INGLÉS Y ...
C ... 13
... MADRID
Tel. ...

que el gen mapeado en 2q37 fuera de hecho el gen del receptor de VIP (Vassart, 1992). La secuencia que designó como GPRN1 Sreedharan et al. (1991) y que se mapeó en 2q37 se encontró que no se unía a VIP según Wenger (1993). Sreedharan et al. (1995) aislaron un gen del receptor de VIP de tipo I auténtico y lo localizaron por fluorescencia de hibridación in situ en la banda de 3p22 en una región asociada al cáncer de pulmón de células pequeñas. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Hashimoto et al. (1999) mapearon el gen Vipr1 de ratón en la región distal del cromosoma 9, una región que muestra homología de sintenia con el cromosoma humano 3p. Sreedharan et al. (1993) clonaron un gen del receptor de VIP intestinal humano, la secuencia de aminoácidos deducida comparte el 84% de identidad con el receptor de VIP de pulmón de rata. Couvineau et al. (1994) aislaron 2 clones de cDNA de VIPR a partir de una biblioteca de cDNA de célula epitelial de yeyuno humano. Uno codifica un receptor de VIP que consiste en 460 aminoácidos y que tiene 7 dominios transmembrana putativos, así como otros receptores acoplados a la proteína G. El otro codifica una proteína relacionada con el receptor de VIP de 495 aminoácidos que exhibe un 100% de homología con el

[illegible] MADRID

receptor de VIP funcional a lo largo de 428 aminoácidos y en la región C-terminal, pero que contiene un dominio N-terminal completamente divergente de 67 aminoácidos. Cuando se expresa en células COS-7, la segunda proteína no une VIP radioyodado, aunque se dirigió normalmente a la membrana plasmática como se evaluó por estudios de inmunofluorescencia. Sreedharan et al. (1995) encontraron que el receptor de VIP de tipo I, también denominado receptor PACAP de tipo II (véase 102981 para otro tipo de receptor PACAP) abarcaba aproximadamente 22 kb y comprendía 13 exones (entre 42 y 1.400 pb) y 12 intrones (entre 0,3 y 6,1 kb). Sreedharan et al. (1995) caracterizaron también le promotor y la región adyacentedel extremo 5' del gen".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre el VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a VIPR2 o VPAC2 se ha extraido de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP, 192320) y el polipéptido activante de la adenilato ciclasa en pituitaria (PACAP, 102980) son péptidos homólogos que

MADRID

funcionan como neurotransmisores y como hormonas neuroendocrinas. Aunque los receptores de VIP y PACAP comparten homología, difieren en sus especificidades de sustrato y en sus patrones de expresión. Veáse VPR1 (192321) y ADCYAP1R1 (102981). Svoboda et al. (1994) realizaron una PCR de bajo rigor utilizando cebadores basados en secuencias conservadas entre los receptores de VIP. Clonaron el gen del receptor de VIP2 humano de una biblioteca de cDNA de linfoblasto. Este gen codificaba un polipéptido de 438 aminoácidos que comparte el 86% de identidad con el receptor de VIP2 de rata. Expresaron el receptor de VIP2 humano en células de ovario de hámster chino y encontraron que se une a PACAP-38, PACAP-27, VIP y helodermina, y esa unión del receptor a cualquiera de estos péptidos activa la adenilato ciclasa. Se encontró que la unión de los péptidos estaba inhibida por GTP. Adamou et al. (1995) clonaron el gen del receptor de VIP2 de una biblioteca de cDNA de placenta humana. La transferencia Northern reveló que VIPR2 se expresaba como 2 transcriptos de 4,6 kb y 2,3 kb a altos niveles en el músculo esquelético y a niveles menores en corazón, cerebro, placenta y páncreas. Mackay et al. (1996) utilizaron hibridación in situ con fluorescencia para mapear el gen VIPR2. Posteriores

PATRICIA ... MORENO
ING. ... ...AN
C. ... ..., 113
Teléf. 51... - MADRID

mapeados con líneas celulares derivadas de pacientes con holoprosencefalia tipo 3 (HPE 3, 142945) revelaron que el gen VIPR2 se encuentra en la región crítica mínima HPE3. MacKay et al (1996) afirmaron que aunque VIPR2 puede contribuir al fenotipo de HPE3, no es el único factor responsable".

AC (adenilato ciclasa)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es la AC.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de AC están disponibles en la bibliografía.

Para confirmar que el VIP induce la vasorrelajación a través de la elevación de los niveles de cAMP intracelular y la consiguiente activación de la adenilato ciclasa, se han medido las concentraciones de cAMP vaginal durante la estimulación con VIP y se ha utilizado forscolina, un activador de adenilato ciclasa, para imitar los efectos de activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa.

En estos estudios, se encuentra que el tratamiento con VIP y forscolina eleva las concentraciones intracelulares de

[illegible] MORENO
[illegible] Y [illegible]AN
[illegible] 113
[illegible]DRID
Tel. [illegible]

cAMP en tejido vaginal aislado.

También se encuentra que la forscolina aumenta el flujo sanguíneo vaginal en un modelo animal de excitación sexual.

Además encontramos que la forscolina induce la relajación en la vagina aislada.

Las explicaciones de los antecedentes sobre la AC y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/-Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a la AC se ha extraído de esa fuente.

> "La adenilato ciclasa (EC 4.6.1.1) cataliza la transformación de ATP en AMP cíclico. La actividad enzimática está bajo el control de varias hormonas, y diferentes polipéptidos participan en la transducción de la señal del receptor al resto catalítico. Los receptores estimuladores o inhibidores (Rs y Ri) interactúan con las proteínas G (Gs y Gi) que exhiben actividad GTPasa y modulan la actividad de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. Parma et al. (1991) clonaron un cDNA

MORENO
MADRID

correspondiente a adenililciclasa de cerebro humana, simbolizada por ellos como HBAC1. Por hibridación in situ a extensiones cromosómicas en metafase utilizando la sonda de cDNA de cerebro humano, Stengel et al. (1992) mostraron que el gen está localizado en 8q24.2. Se asignó un gen altamente homólogo, ADCY2 (103071) a 5p15.3 mediante el mismo procedimiento".

## TECNICAS DE METODOLOGIA GENERAL DE DNA RECOMBINANTE

Aunque en general las técnicas mencionadas en la presente son bien conocidas en la técnica, puede hacerse referencia en particular a Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) y a Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999), 4ª edición, John Wiley & Sons, Inc. Se describe la PCR en los documentos US-A-4683195, US-A-4800195 y US-A-4965188.

## SUMARIO

En resumen, la presente invención se refiere a:

1. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD,

PATENTES ... MORENO
ING ... MAN
... 13
... MADRID
Teléf.

comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD.

3. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar

MORENO
JUAN
113
MADRID

si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a:

5. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr

PATENTES [illegible] MORENO
INGL[illegible] Y L[illegible]MAN
[illegible] 13
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

1346

$\mathrm{A{:}VIP}_n$

I:I:VIPr

$\mathrm{I{:}I{:}VIP}_n$

$\mathrm{P}_{cAMP}$.

6. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal cómo una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD, en particular FSAD, siendo el agente capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP
$\mathrm{I{:}PDE}_{cAMP}$
$\mathrm{I{:}PDEn}_{cAMP}$
I:NPY
$\mathrm{I{:}NPY\ Y}_n$
I:NEP
$\mathrm{U{:}A}_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
$\mathrm{A{:}VIP}_n$
I:I:VIPr
$\mathrm{I{:}I{:}VIP}_n$
$\mathrm{P}_{cAMP}$.

[illegible] MORENO
[illegible]LEMAN
ING. [illegible] 13
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

7. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP
$I{:}PDE_{cAMP}$
$I{:}PDEn_{cAMP}$
I:NPY
$I{:}NPY\ Y_n$
I:NEP
$U{:}A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
$A{:}VIP_n$
I:I:VIPr
$I{:}I{:}VIP_n$
$P_{cAMP}$.

8. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede tratar a una hembra que sufre FSD, en particular

MORENO
MAN
113
MADRID
Tel

FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo la determinación de si un agente putativo es capaz o no de actuar como uno o más de:

un mimético de cAMP
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

en el que si el agente putativo es capaz de actuar como uno o más de

un mimético de cAMP
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY

[illegible] MORENO
[illegible] IAN
[illegible] 113
[illegible] ADRID

1349

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

$P_{cAMP}$.

entonces el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular FSAD.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a:

9. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimlar la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[illegible]
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
[illegible]

10. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composción farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra.

11. Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra de modo que produzca un aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo).

## EJEMPLOS

La presente invención se describirá a continuación, sólo como ejemplos, en los que se hace referencia a las siguientes Figuras:

La Figura 1 que es un gráfico,
La Figura 2 que es un gráfico,
La Figura 3 que es un gráfico,
La Figura 4 que es un gráfico,
La Figura 5 que es un gráfico,

[illegible] 113
[illegible] - MADRID
Telef. [illegible]

La Figura 6 que es un gráfico,
La Figura 7 que es un gráfico,
La Figura 8 que es un gráfico,
La Figura 9 que es un gráfico,
La Figura 10 que es un gráfico, y
La Figura 11 que es un gráfico.

Más detalladamente:

Figura 1. Estimulación eléctrica del nervio pélvico que induce un aumento dependiente de la frecuencia del flujo sanguíneo vaginal en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Al aumentar la frecuencia de estimulación se inducen mayores aumentos del flujo sanguíneo. Se monitorizaron los cambios utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 2. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. La Figura 2A ilustra cómo aumenta el flujo sanguíneo vaginal de manera dependiente de la concentración por infusiones de VIP (bolo intravenoso). La Figura 2b demuestra que 2 infusiones repetidas de VIP producen aumentos similares del flujo sanguíneo. Obsérvese que la duración de la respuesta es

[illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

también similar. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 3. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) reduce la presión sanguínea arterial media en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Este gráfico ilustra los efectos típicos de los agentes vasoactivos, y los parámetros de estimulación utilizados para investigar el flujo sanguíneo en la vagina, respecto a la presión arterial media en un conejo anestesiado. Estos efectos observados son típicos de las tendencias vistas en todos los animales ensayados. El VIP indujo una depresión significativa de la presión arterial media mientras la estimulación del nervio pélvico, no teniendo efecto las infusiones de control de hepsalina o de inhibidores de $PDE_{cAMP}$ o NEP sobre la presión sanguínea. Obsérvese que la reducción de la presión sanguínea asociada con las infusiones de VIP está también asociada a un gran aumento del ritmo cardiaco.

Figura 4. La activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa imita la vasorrelajación mediada por VIP y la relajación de músculo liso en tejido vaginal. La Figura 4a ilustra que una infusión de forscolina (un mimético de cAMP, 40 nmol/kg/bolo intravenoso) induce aumentos

MORENO
MADRID

significativos del flujo sanguíneo vaginal. Obsérvese que la amplitud y duración de la respuesta es similar a la inducida por el VIP (20,0 µg/kg bolo intravenoso). Resulta interesante que los efectos sobre el flujo sanguíneo tienen una duración mayor de acción sobre la pared vaginal externa. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler. La Figura 4b demuestra que tanto el VIP (0,1 µM) como la forscolina (10 µM) elevan significativamente las concentraciones intracelulares de cAMP por encima de los niveles basales en vagina de conejo. La Figura 4c muestra que la forscolina induce potentes relajaciones en bandas vaginales de conejo precontraídas (1 µM de fenilefrina) con un CI de aproximadamente 300 nM. Se cuantificaron todos los cambios utilizando tecnologías de láser Doppler in vivo, enzimoinmunoensayo de cAMP bioquímico o de relajación de tejidos in vitro.

Figura 5. La infusión de VIP aumenta el flujo sanguíneo clitorídeo y la activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa imita la vasorrelajación clitorídea mediada por VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. La infusión de VIP (60-200 µg/kg) induce un aumento dependiente de la concentración del flujo sanguíneo clitorídeo. Se observó un aumento del 115% del flujo sanguíneo clitorídeo después de una infusión intravenosa

[illegible] MORENO
[illegible] Y ALEMAN
[illegible] no, 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

de 200 µg/kg de VIP. Los efectos de VIP sobre el flujo sanguíneo clitorídeo pueden imitarse por una infusión del mimético de cAMP, forscolina (FSK, 40 nmol/kg bolo intravenoso). Se observó un aumento del 156% del flujo sanguíneo clitorídeo después de una infusión intravenosa de 40 nmol/kg de. forscolina. Todos los aumentos fueron significativamente elevados respecto de las infusiones control (suero salino heparinizado). Obsérvese que la amplitud de la respuesta es similar a la inducida por VIP (200 µg/kg, bolo intravenoso) y comparable a las observadas en el flujo sanguíneo vaginal de las figuras 2 y 4. Se cuantificaron todos los cambios por tecnologías de láser Doppler in vivo y eran significativamente superiores comparados con las infusiones de vehículo (suero salino heparinizado).

Figura 6. Un inhibidor selectivo de NEP EC 3.4.24.11 estimula el aumento del flujo sanguíneo vaginal por estimulación del nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. PNS repetidas con intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (barra blanca). La administración de un inhibidor de NEP (barra gris) estimula el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4Hz), comparado con

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] ADRID

los aumentos observados durante las estimulaciones de control o los controles de vehículo coincidentes en el tiempo (barra rayada). Se observaron los siguientes aumentos dependientes de la dosis: 0,3 mg/kg, iv, indujo un aumento del 40% y 1,0 mg/kg, iv, indujo un aumento del 91% (n media = 3). El inhibidor de NEP no tuvo efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (no estimulado) (datos no mostrados). Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 7. Los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 estimulan los aumentos de flujo sanguíneo vaginal inducidos por VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las infusiones de VIP repetidas en intervalos de 30 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b). El inhibidor de NEP potencia la amplitud y prolonga la duración del flujo sanguíneo estimulado cuando estos aumentos estan inducidos por dosis submáximas de VIP, por ejemplo 6,0 µg/kg. A dosis de VIP que inducen aumentos máximos del flujo sanguíneo vaginal, por ejemplo 60 µg/kg, los inhibidores de NEP potencian sólo la duración del flujo sanguíneo vaginal. Se muestran los aumentos inducidos por VIP en presencia de un inhibidor de NEP como triángulos negros, mostrándose las respuestas de control VIP como triángulos blancos. La

PATENTES ... MORENO
... LUCAN
... na, 113
... MADRID
Telf. ...

1356

infusión de control de hepsalina no tiene efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando técnologías de láser Doppler.

Figura 8. Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal estimulados por el nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las PNS repetidas en intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (cuadrados blancos). La administración del inhibidor de $PDE_{cAMP}$ tipo 2 estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (cuadrados negros, a 4Hz) comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control coincidente en el tiempo (cuadrados blancos). Una infusión del inhibidor PDE2 (500 µg/kg) indujo una estimulación de 86,8 ± 21,9% del flujo sanguíneo vaginal (media ± s.e.m. error típico de la media), n= 2). Todos los cambios se monitorizaron utilizando técnologías de láser Doppler.

Figura 9: Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal inducidos por el VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las infusiones de VIP repetidas en intervalos de

MORENO
MADRID
Teléf. 519

30 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b). Un inhibidor selectivo de $\text{PDE}_{cAMP}$ de tipo 2 (25 µg/kg, bolo intravenoso) potencia la duración del flujo sanguíneo vaginal estimulado inducido por VIP (60 µg/kg, bolo intravenoso). Los aumentos inducidos por el VIP en presencia de un inhibidor de $\text{PDE}_{cAMP}$ se muestran como triángulos negros, mientras que las respuestas control de VIP se muestran como triángulos blancos. La infusión control de hepsalina no tuvo efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 10. Un antagonista selectivo de los receptores de NPY Y1 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal estimulados por el nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las PNS repetidas en intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (datos no mostrados). La administración de un antagonista de NPY Y1 (barra gris) estimula el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4Hz), comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control o los controles de vehículo coincidentes en el tiempo (barra rayada). Se observaron los siguientes aumentos dependientes de la dosis: 0,01 mg/kg,

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

iv, indujo un aumento del 15,8 ± 19,6%, 0,03 mg/kg, iv, indujo un aumento del 35,1 ± 17,17%, 0,10 mg/kg indujo un aumento del 60,1 ± 16,9% y 0,3 mg/kg indujo un aumento del 91,1 ± 27,4% (media ± s.e.m. n = 3). El antagonista de NPY Y1 no tuvo efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (no estimulado) (datos no mostrados). Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

La Figura 11 proporciona un gráfico resumen para algunos de los datos proporcionados en la presente, que muestra que los agentes de la presente invención son muy útiles para aumentar el flujo sanguíneo vaginal por potenciación de los niveles de cAMP endógeno.

## UN ENSAYO PARA MEDIR LAS ACTIVIDADES/NIVELES DE cAMP

Medida de cAMP en muestras de tejidos vaginales utilizando un estuche de enzimoinmunoensayo (EIA) para cAMP de Biotrak (Amersham Life Sciences RPN 225).

Los niveles de cAMP se miden por EIA en muestras de tejido vaginal. El EIA se basa en la competición entre cAMP sin marcar y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa para una cantidad limitada de anticuerpo específico de cAMP.

PATENTES ... MORENO
... SAN
... 113
... MADRID
Teléf. ...

1. MATERIALES

Todos los materiales son suministrados por el estuche EIA para cAMP de Amersham Life Sciences (RPN 225), a menos que se indique otra cosa.

1.1 Placa de microvaloración. Placa de 96 pocillos recubierta con IgG de asno anti-conejo.

1.2 Tampón de ensayo. Tampón acetato de sodio 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Los contenidos del frasco se transfieren a una probeta graduada utilizando lavados de agua destilada, 3 x 15 ml. El volumen final se ajusta entonces a 500 ml.

1.3 Patrón de cAMP (para el procedimiento de acetilación). cAMP a 10,24 pmol/ml en tampón acetato 0,05, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Se disuelve el patrón en 2,5 ml de tampón de ensayo para su uso.

1.4 Antisuero. Anticuerpo anti-cAMP en tampón acetato 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Antes de su uso, se diluye el anticuerpo con 11 ml de tampón de ensayo y se mezcla por inversión suave para disolver los contenidos.

Telef. 519 - MADRID

1360

1.5 Conjugado de cAMP. cAMP-peroxidasa de rábano picante en tampón acetato 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Antes de su uso, se diluye la disolución con 11 ml de tampón de ensayo y se mezcla por inversión suave para disolver los contenidos.

1.6 Tampón de lavado. Tampón fosfato 0,01 M, pH 7,5, que contiene Tween™20 al 0,05% (v/v) tras su reconstitución. Se transfieren los contenidos del frasco a una probeta graduada utilizando lavados de agua destilada, 3 x 15 ml. El volumen final se ajusta a 500 ml.

1.7 Sustrato TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)/peróxido de hidrógeno en dimetilformamida al 20% (v/v).

Preparado para su uso.

1.8 Reactivo de acetilación. 2 ml de anhídrido acético, 4 ml de trietilamina, preparado según sea necesario.

1.9 Acido sulfúrico (1M). Se prepara ácido sulfúrico 1 M a partir de una disolución madre 18M (BDH).

Se añaden 1,11 ml a 18,8 ml de agua destilada.

## 2. EQUIPAMIENTO ESPECIFICO

2.1 Tubos de ensayo de vidrio de 5 ml desechables.

2.2 Lector espectrofotométrico de placas (Spectra max 190)

[illegible] 113 [illegible] MADRID

2.3 Agitador de placas de microvaloración (Luckham R100).

## 3. PROCEDIMIENTOS

- Preparación de muestras de tejido. Se trataron los tejidos con el pretratamiento relevante en muestras de 5 ml en disolución salina fisiológica, por ejemplo, agonistas, miméticos de cAMP, etc. Después del tratamiento, las muestras se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y después se trituraron utilizando un martillo. Se rascó el polvo en un tubo de centrífuga y se añadió 1 ml de ácido perclórico (PCA) 0,5 M enfriado con hielo. Se agitó en Vortex la muestra, se mezcló y se dejó en hielo durante 1 hora.
- Extracción de cAMP de muestras de tejido. Se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en otros tubos de centrífuga. Se conservó el sedimento para análisis de proteína a -80°C. Se neutralizaron después las muestras de sobrenadante a pH 6 utilizando $K_3PO_4$. Se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se lavó 4 veces con 5 volúmenes (5 ml) de éter dietílico saturado de agua. Se desechó la capa superior de éter después de cada lavado. Se transfirió la capa acuosa a un tubo corto de vidrio fino y se secó en

[illegible] 113 [illegible] MADRID

atmósfera de nitrógeno a 60°C. Se disolvió el extracto seco en 1 ml de tampón de ensayo y se almacenó en nevera hasta que fue necesario (o también puede congelarse).

- Se equilibran las disoluciones madre de los reactivos a temperatura ambiente y se preparan las disoluciones de trabajo.

- Se preparan los patrones de cAMP en tubos de vidrio etiquetados como 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 fmol. Esto se consigue añadiendo 1 ml de tampón de ensayo a todos los tubos excepto al de patrón de 512 fmol. Se añade entonces 1 ml de patrón de acetilación (10,24 pmol/ml) a los dos patrones superiores (256 y 512 fmol. Se agita con Vortex el patrón de 256 fmol y se transfiere 1 ml al patrón de 128 fmol. Esto se vuelve a llevar a cabo hasta el patrón de 2 fmol, en el que se dispone 1 ml de disolución. Se establece un tubo patrón cero que contiene 1 ml de tampón de ensayo.

- Se descongelan las muestras de extractos de tejidos en hielo (si es necesario) y se diluyen 1 a 100 (10 $\mu$l de muestra en 990 $\mu$l de tampón de ensayo) en tubos de vidrio etiquetados.

- Se acetila el cAMP en todos los patrones y muestras por adición de 100 $\mu$l de reactivo de acetilación, en campana de gases, que se añaden en un lado del tubo antes de la inmediata agitación en Vortex.

MADRID

Se añaden 50 µl de todos los patrones y muestras a los pocillos apropiados de la placa de 96 pocillos, y se añaden 150 µl de tampón de ensayo a los pocillos de unión no específica (NSB).

- Se añaden 100 µl de antisuero a todos los pocillos excepto a los blancos (B) y a los NSB antes de incubar durante 2 horas a 3-5°C
- Después de la incubación, se añaden 100 µl de conjugado cAMP-peroxidasa a todos los pocillos excepto a los B antes de 1 hora más de incubación a 3-5°C.
- Se vacían las placas dándoles la vuelta y transfiriendo a un papel absorbente antes de lavar cada pocillo cuatro veces con 400 µl de tampón de lavado. Después de cada lavado se retransfieren las placas para asegurar que se extrae cualquier tampón de lavado residual. Se añaden inmediatamente después 200 µl de TMB a todos los pocillos.
- Se ponen las placas en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1 M en todos los pocillos. Se lee la densidad óptica en un dispositivo Spectra max 190 a 450 nm durante 30 minutos.

## 4. PATRONES

Se establecen con cada ensayo los siguientes tubos patrones:

### 4.1 Adición de un patrón en tampón de ensayo

Se añade una cantidad conocida de cAMP en tampón de ensayo para determinar la eficacia del ensayo. Se añaden 70 pmol/ml de cAMP al tampón de ensayo, que es equivalente a 35 fmol/pocillo en el ensayo, que está en la mitad de la curva de respuesta a la dosis.

Para preparar 1 ml de patrón: 68,4 µl de patrón 521 fmol/pocillo en 931,6 µl de tampón de ensayo

### 4. Efectos de los compuestos sobre la placa

Se establecen los patrones para determinar si el compuesto utilizado en los estudios funcionales tiene algún efecto sobre la placa de 96 pocillos o si afecta a la unión de cAMP. Estos incluyen:

- Adición del compuesto en tampón de ensayo por separado para evaluar los efectos del compuesto directamente sobre la placa.

MORENO
13
MADRID

- Adición del compuesto en plasma que contiene niveles basales de cAMP para evaluar los efectos del compuesto sobre la unión de cAMP a la placa.

Se añaden concentraciones 5 nM de compuesto a cada patrón. Se elige 5 nM porque los niveles de medicamento total al final de la infusión han sido en el pasado de aproximadamente 150-300 nM. Se diluyen las muestras 1:100 antes de ensayar, por lo tanto 5 nM permite concentraciones de medicamento mayores de las esperadas al final de la infusión.

## 5. CALCULOS

El lector de placas Spectra max lee la densidad óptica (DO) a 450 nm.

La curva patrón se genera por representación del $\%B/B_0$ (eje y) frente a fmol/pocillo de cAMP (eje x) en Spectra max.

El $\%B/B_0$ (% unido) para cada muestra y patrón se calcula como sigue:

$B_0$ = patrón cero (véase el procedimiento 3.2).

$$\%B/B_0 = \frac{\text{(DO de patrón o muestra-DO de NSB)}}{\text{(DO de } B_0 \text{ - DO de NSB)}} \times 100$$

El volumen fmol/pocillo puede leerse entonces directamente en la curva patrón para cada muestra. Entonces se convierten los valores en pmol/ml antes de tomar la media de cada par de muestras.

Conversión de valores de fmol/pocillo a pmol/ml:

fmol a pmol = dividir entre 1000
volumen en pocillo = 50 µl ... (x1000)
50
La muestra se diluye 1/100, así que en conjunto = 1 x 1000/1000 x 100/50 = 2

Así que todos los valores de fmol/pocillo se multiplican por 2 para dar pmol/ml.

## MODELO DE ENSAYO ANIMAL

LA POTENCIACION DE LOS EFECTOS DEL 3'-5'-MONOFOSFATO DE ADENOSINA CICLICO (cAMP) DA COMO RESULTADO AUMENTOS DEL FLUJO SANGUINEO VAGINAL EN EL MODELO EN CONEJO ANESTESIADO DE EXCITACION SEXUAL.

[illegible] MADRID

## 1.0 Objetivos

1. Desarrollar y validar un modelo animal de excitación sexual femenina.
2. Identificar el (los) mecanismo(s) responsable(s) de la regulación del flujo sanguíneo genital en conejo anestesiado.
3. Identificar los enfoques potenciales para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo.
4. Investigar el (los) mecanismo(s) que subyacen a la relajación del músculo liso vaginal e identificar los enfoques potenciales para la estimulación de la relajación vaginal.

## 2.0 Introducción

La respuesta de excitación sexual normal consiste en una serie de respuestas fisiológicas que se observan durante la excitación sexual. Estos cambios, como congestión vaginal, labial y clitorídea son el resultado de aumentos en el flujo sanguíneo genital. La congestión conduce a un aumento de la lubricación a través de la trasudación de plasma, aumento de la flexibilidad vaginal (relajación del músculo liso vaginal) y aumento de la sensibilidad vaginal

PATRICIA ... MORENO
INGLES Y ALEMAN
... 13
MADRID
Tel. ...

y clitorídea.

El trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) es un trastorno sexual altamente prevalente que afecta a mujeres pre-, peri- y postmenopáusicas (±HRT). La consecuencia primaria del FSAD es la falta de congestión o tumefacción, que se manifiesta como falta de lubricación vaginal y falta de sensación genital placentera. Las consecuencias secundarias incluyen una reducción del deseo sexual, dolor durante el coito y dificultades para conseguir un orgasmo. La causa más común de los FSAD es una reducción del flujo sanguíneo genital que se traduce en una reducción de la congestión vaginal, labial y clitorídea. (Park 1997, Goldstein 1998, Berman 1999a, Werbin 1999).

La presente invención proporciona los medios para recuperar o potenciar la respuesta de excitación sexual normal en mujeres que sufren FSAD por estimulación del flujo sanguíneo genital.

En los estudios de los presentes autores se ha identificado el cAMP (3',5'-monofosfato de adenosina cíclico) como un mediador de la vasorrelajación vaginal utilizando tecnología de láser Doppler para medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo genital. Esto ha implicado desarrollar

MADRID

un modelo animal de excitación sexual y demostrar que los datos reflejan los cambios fisiológicos observados durante la excitación sexual femenina. El modelo se ha utilizado entonces para identificar y validar mecanismos que estimulan el flujo sanguíneo genital, por ejemplo por potenciación directa o indirecta de la vasorrelajación mediada por cAMP.

## 3.0 Procedimientos

### 3.1 *Protocolo anestésico*

Se premedicaron conejos hembra de Nueva Zelanda (aproximadamente 2,5 kg) con una combinación de medetomidina (Dormitor$^{(R)}$) 0,5 ml/kg intramuscular, y ketamina (Vetalar$^{(R)}$) 0,25 ml/kg intramuscular manteniendo la toma de oxígeno con una mascarilla facial. Se traqueotomizaron los conejos utilizando un tubo endotraqueal sin boquilla Portex™ 3ID conectado a un ventilador y se mantuvieron a una tasa de ventilación de 30-40 respiraciones por minuto, con un volumen de flujo periódico aproximado de 18-20 ml y una presión máxima en las vías aéreas de 10 cm de $H_2O$. Se cambió entonces la anestesia a isoflurano y siguió la ventilación con $O_2$ a 2 l/min. Se canuló la vena marginal de la oreja derecha

MADRID

utilizando un catéter 23G o 24G y se perfundió una disolución Ringer con lactato a 0,5 ml/min. Se mantuvo el conejo con isoflurano al 3% durante la cirugía invasiva, bajando a 2% para la anestesia de mantenimiento.

### 3.2 *Canulación de vasos*

Se afeitó el área de la ingle izquierda del conejo y se realizó una incisión vertical de aproximadamente 5 cm de longitud a lo largo del muslo. Se expusieron la vena y la arteria femorales, se aislaron y se canularon con un catéter de PVC (17G) para la infusión de medicamentos y compuestos. Se repitió la canulación para la arteria femoral, insertando el catéter a una profundidad de 10 cm para asegurar que el catéter alcanzaba la aorta abdominal. Se unió el catéter arterial a un sistema Gould para registrar la presión sanguínea. Se tomaron muestras para análisis de gases en sangre a través del catéter arterial. Se midieron las presiones sistólica y diastólica y se calculó la presión arterial media utilizando la fórmula (diastólica x 2 + sistólica) : 3. Se midió el ritmo cardiaco mediante un oxímetro de pulsos y el sistema de software de adquisición de datos Po-ne-mah (Ponemah Physiology, Gould Instrument Systemas Inc.).

MADRID

### 3.3 *Estimulación del nervio pélvico*

Se realizó una incisión ventral de línea media en la cavidad abdominal. La incisión fue de unos 5 cm de longitud justo por encima del pubis. La grasa y el músculo se apartaron directamente para descubrir el nervio hipogástrico que recorre la cavidad corporal. Era esencial mantenerse cerca del lado curvo de la pared del pubis para evitar dañar la vena y la arteria femorales que se encuentran por encima del pubis. Los nervios ciático y pélvico se encuentran más profundos y fueron localizados después de una disección adicional del lado dorsal del conejo. Una vez se identificó el nervio ciático, se localizó fácilmente el nervio pélvico. El término nervio pélvico se aplica aproximadamente, los libros de anatomía sobre el tema no consiguen identificar los nervios con suficiente detalle. Sin embargo, la estimulación del nervio produce un aumento del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo, y la inervación de la región pélvica. El nervio pélvico se liberó del tejido circundante y se colocó un electrodo estimulante Harvard dipolar alrededor del mismo. Se levantó ligeramente el nervio para proporcionar algo de tensión, después se aseguró el electrodo en la posición. Se colocó aproximadamente 1 ml de aceite de parafina ligera alrededor del nervio y el electrodo. Esto actúa como

MADRID

lubricante protector para el nervio y evita la contaminación de la sangre con el electrodo. Se conectó el electrodo a un estimulador Grass S88. Se estimuló el nervio pélvico utilizando los siguientes parámetros: 5V, anchura del pulso 0,5 ms, duración del estímulo 10 segundos e intervalo de frecuencia de 2 a 16 Hz. Se obtuvieron respuestas reproducibles cuando se estimuló el nervio cada 15-20 minutos.

Se determinó una curva de respuesta a la frecuencia al inicio de cada experimento para determinar la frecuencia óptima para usar como respuesta submáxima, normalmente 4 Hz. El(los) compuesto(s) a ensayar se infundieron, a través de la vena femoral, utilizando una bomba de infusión Harvard 22, permitiendo un ciclo de estimulación continuo de 15 minutos.

### 3.4 *Colocación de las sondas de láser Doppler*

Se realizó una incisión ventral de línea media en el extremo caudal del pubis para exponer el área púbica. Se eliminó el tejido conectivo para exponer la túnica del clítoris, asegurando que la pared estaba libre de pequeños vasos sanguíneos. Se expuso también la pared vaginal externa por eliminación del tejido conectivo. Se insertó

MADRID

una sonda de flujo de láser Doppler 3 cm en la vagina, de modo que el eje de la sonda siguiera visible. Se posicionó una segunda sonda de modo que se encontrara justo por encima de la pared externa clitorídea. Se ajustó entonces la posición de estas sondas hasta obtener una señal. Se colocó una segunda sonda justo por encima de la superficie de un vaso sanguíneo de la pared vaginal externa. Ambas sondas se fijaron en sus posiciones.

Se registraron el flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo directamente como números a partir del medidor de flujo, utilizando el software de adquisición de datos Po-ne-mah (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument System Inc.), o indirectamente a partir de la señal del registro gráfico Gould. Se fijó la calibración al inicio del experimento (0-125 ml/min/100 g tejido).

### 3.5 *Infusión de péptido intestinal vasoactivo (VIP)*

Las dosis de VIP (Bachem, H-3775) infundidas fueron 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 µg/kg intravenosas y se infundieron en un volumen de 0,5 ml de suero salino. El VIP se infundió utilizando una bomba Harvard 22, infundiendo a 500 µl/min a través de una llave de tres vías en la vena femoral. Después de la infusión de VIP, se lavó el catéter con suero salino heparinizado (Hepsalina) de modo que no quedara VIP en el catéter.

Para experimentos que utilizan infusiones de VIP, existía la necesidad de una curva de respuesta a la dosis inicial de sensibilización (2-60 μg/kg), para poder obtener respuestas reproducibles. Se infundió una infusión inicial de Hepsalina (50 UI/ml) para que actuara como control negativo.

### 3.6 *Infusión de inhibidores*

Se prepararon inhibidores de NEP (endopeptidasa neutral EC3.4.24.11), inhibidores de fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE5) y antagonistas de NPY Y1 en suero salino o disolución de glucosa al 5% (200 μl de glucosa al 50% en 1,8 ml de agua para inyecciones). Los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ se disolvieron en una disolución de etanol al 40% (200 μl de glucosa al 50% en 1,8 ml de agua/etanol para inyección). Se infundieron los inhibidores y los controles de vehículo a la misma velocidad que el VIP. Los inhibidores de NEP se dejaron durante 30 minutos antes de la curva de respuesta a la dosis de VIP, mientras que los inhibidores de NEP, antagonistas de receptor de NPY Y1 e inhibidores de $PDE_{cAMP}$ se dejaron durante 15 minutos antes de la estimulación del nervio pélvico.

3.7 *Medida de la relajación del músculo liso en vagina de conejo aislada*

3.7 (a). Preparación de vagina de conejo in vitro: Se sacrificaron conejos blancos hembras de Nueva Zelanda (2,0-3,0 kg) por dislocación cervical. Se abrió la cavidad abdominal y se extrajo la vagina. Se montaron longitudinalmente bandas de tejido en cámaras de órganos silanizadas de 5 ml de Wesley Co. con suturas de seda trenzada (calibre 6/0) a una tensión en reposo inicial de 1,5 Kg en tampón bicarbonato de Krebs mantenido a 37°C y gasificado con 95% $O_2$/5% $CO_2$. Se unió la ligadura superior de cada banda de tejido a un transductor de desplazamiento de fuerza de 10 g de capacidad y se midieron y registraron los cambios en la fuerza isométrica utilizando un sistema de captura de datos in vitro DART. Se dejaron equilibrar los tejidos durante 1,5 horas y se lavaron regularmente con Krebs.

3.7 (b). Relajación inducida por el péptido intestinal vasoactivo en vagina de conejo: Se contrajo cada tejido utilizando una concentración de baño 1 $\mu$M de fenilefrina. Cuando la respuesta contráctil alcanzó una meseta estable

MADRID

(aproximadamente 15 minutos), se añadió acumulativamente VIP a la cámara de órganos en unidades logarítmicas para producir concentraciones de 0,1 a 100 nM. Se midieron las respuestas de relajación 5 minutos después de la adición de cada concentración de VIP, consiguiéndose la máxima relajación en ese momento. Después los tejidos recibieron un agente de ensayo (por ejemplo inhibidor de NEP o de PDE) o el vehículo DMSO (control de tiempo coincidente).

3.7 (c). Análisis de datos para experimentos de relajación por VIP: Para cada curva de respuesta concentración de VIP-relajación, se expresaron las respuestas de relajación inducidas por VIP como un porcentaje de la contracción máxima inducida por fenilefrina. Estos valores se representaron entonces frente al logaritmo de la concentración de VIP y se ajustaron a curvas sigmoideas. Con fines de ajuste de curvas, se limitó la respuesta de relajación mínima al 0% y se dejó ajustar libremente la máxima respuesta de relajación. Se determinó la concentración de VIP requerida para producir una relajación del 50% de la contracción de fenilefrina ($CE_{50\ PE}$).

3.7 (d). Relajación estimulada por campo eléctrico de vagina de conejo: Se prepararon las bandas vaginales de conejo como se ha descrito en la sección 3.7 (a). Se

INC. ... 113 ... MADRID
Teléf.

montaron las bandas de tejido entre dos electrodos de platino situados en la parte superior e inferior de la cámara de órganos, separados unos 4 cm. Cada tejido se contrajo utilizando una concentración de baño 1 µM de fenilefrina. Cuando la respuesta contráctil alcanzó una meseta estable (15 minutos), los tejidos experimentaron un pretratamiento de curva de relajación inducida estimulada por campo eléctrico (EFS). Este se realizó a entre 40 y 60 voltios utilizando frecuencias secuenciales de 2, 4, 8 y 16 Hz suministradas como series de 10 segundos con anchura de pulso de 0,5 ms. Se dejaron volver los tejidos a la línea base de tensión precontráctil entre cada frecuencia (5 minutos) y se registró la extensión de la respuesta de relajación.

Después de terminar el pretratamiento de curva de respuesta inducida por EFS, se lavaron todos los tejidos durante 15 minutos, dejando a los tejidos volver a la tensión de línea base. Entonces los tejidos recibieron un agente de ensayo (por ejemplo un inhibidor de NEP o de PDE, inhibidor de óxido nítrico sintasa (NOS)) o vehículo DMSO (control de tiempo coincidente). Se recontrajeron los tejidos con fenilefrina (1 µM) 15 minutos después de la adición del compuesto o de vehículo y se determinó una curva de respuesta de relajación inducida por EFS como se ha

MORENO
Y ALEMAN
113
MADRID
Telf.

descrito anteriormente.

Para los experimentos EFS, se complementó el medio Krebs con atropina (10 µM) y guanetidina (150 µM) para eliminar cualquier inervación colinérgica o adrenérgica de la vagina.

### 3.8 *Medida de los niveles de cAMP en vagina de conejo aislada*

Se realizó la medida de las concentraciones de cAMP a partir de extractos de tejido vaginal utilizando un estuche de enzimoinmunoensayo (EIA) de cAMP Biotrak (Amersham Life Sciences, RPN 225). Se trataron las muestras de tejido vaginal aislado con agentes de ensayo (por ejemplo forscolina o VIP). Después de 5 minutos, se congelaron inmediatamente las muestras utilizando nitrógeno líquido, se homogeneizaron y se extrajo el cAMP. Se miden los niveles de cAMP por EIA. El EIA está basado en la competición entre el cAMP sin marcar y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa para una cantidad limitada de anticuerpo específico de cAMP.

### 3.9 *Medida de la actividad fosfodiesterasa (PDE) en vagina de conejo aislada*

[illegible]
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. [illegible] - MADRID

Se obtuvieron extractos de citosol de pared vaginal humana de ABS Inc., Delaware (edad de las donantes de 41 a 60 años). Se separaron las isoenzimas PDE por cromatografía de intercambio aniónico Mono-Q y se caracterizaron basándose en su selectividad de sustrato, su sensibilidad a moduladores alostéricos y en sus inhibidores selectivos. También se realizaron análisis Western utilizando anticuerpos de isoenzimas específicas de PDE para detectar la expresión de PDE en la vagina humana.

Todos los datos se comunican como media ± s.e.m. Los cambios significativos se identificaron utilizando ensayos de t de Student.

## 4.0 Resultados y Discusión

### 4.1 *Modelo animal de excitación sexual*

En los estudios de los presentes autores se ha desarrollado un modelo reproducible y robusto de la fisiología de la excitación sexual. Utilizando este modelo de conejo anestesiado, son capaces de medir pequeños cambios del flujo sanguíneo genital utilizando tecnología de láser Doppler. La estimulación del nervio pélvico se utiliza para simular los efectos neuronales de la excitación sexual.

MORENO
ALEMAN
113
90 - MADRID

Se ha encontrado que la estimulación del nervio pélvico inducía aumentos dependientes de la frecuencia del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo (véase la figura 1). Los aumentos del flujo sanguíneo vaginal son significativos cuando se registran en la pared intra o extravaginal. La estimulación del nervio pélvico a 2Hz indujo una elevación media del flujo sanguíneo vaginal máximo de 10,3 ± 1,8, a 4 Hz 20,0 ± 4,6, a 8 Hz 36,3 ± 4,8 y a 16 Hz 46,6 ± 4,7 ml/min/100 g de tejido (n= 4), 15-20 V, 0,5 ms, 10 s) y aumentos del flujo sanguíneo clitorídeo de 14,7 ± 3,6 a 2Hz, 29,4 ± 1,4 a 4Hz y 69,7 ± 2,1 a 8 Hz. Estos valores son de amplitud similar a los observados anteriormente en estudios humanos y en modelos animales de excitación (Berman 1999a, Park 1997).

Se ha encontrado que la estimulación submáxima del nervio pélvico da como resultado aumentos reproducibles del flujo sanguíneo genital (por ejemplo la estimulación con 4 Hz cada 15 minutos proporcionó un aumento medio de 8,50 ± 0,10 ml/min/100 g de tejido, n= 8 y un aumento medio del flujo sanguíneo clitorídeo de 13,65 ± 0,86 ml/min/100 g de tejido, n= 11). Esta reproducibilidad se mantiene durante hasta 5 horas. Podemos utilizar la reproductibilidad de estas respuestas para investigar a) la identidad de los agentes/mecanismos vasoactivos endógenos que median la

113 - MADRID

congestión genital y b) la influencia de los medicamentos que pueden ser eficaces en la estimulación del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo.

Los autores encontraron que no hay efectos cardiovasculares adversos asociados a la estimulación del nervio pélvico en el conejo anestesiado (véase la figura 3).

El flujo sanguíneo genital aumenta durante la excitación sexual (Berman, 1999) a través de un aumento del suministro de sangre arterial (la arteria vaginal, la rama vaginal de la arteria uterina, la arteria genital interna y las ramas medias de la arteria media rectal están todas implicadas en el suministro de sangre a la vagina y el clítoris). El nervio pélvico, que tiene su origen en las regiones espinales S2/S4, inerva los genitales femeninos y tiene ramas que terminan en la vagina inferior, el clítoris y los vasos sanguíneos relacionados. Mediante la estimulación del nervio pélvico, se pueden simular los efectos sobre el flujo sanguíneo observados durante la excitación sexual, es decir, un aumento del flujo sanguíneo genital arterial. De forma interesante, el aumento de flujo sanguíneo arterial no se ve reflejado en un vaciado venoso que permita a las redes capilares congestionarse con la sangre. La congestión vaginal conduce a la lubricación vaginal a

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

través de trasudación de plasma y esta es una de las primeras respuestas pélvicas observadas durante la estimulación sexual. Los neurotransmisores que se liberan con la estimulación del nervio pélvico o durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. Los nervios que contienen los neuropéptidos y otros candidatos a neurotransmisores que inervan la vasculatura y microvasculatura de la vagina y del clítoris, han sido identificados inmunohistoquímicamente. Estos estudios indican que el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), el neuropéptido Y (NPY), óxido nítrico sintasa (NOS), la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) están todos presentes en los nervios que inervan la vagina y el clítoris humanos. (Hoyle, 1996; Burnett, 1997; Hauser-Kronberger, 1999).

### 4.2 *Validación del modelo de conejo anestesiado de excitación sexual*

Para traducir los datos de flujo sanguíneo generados utilizando este modelo a los observados en un modelo humano de excitación sexual, se comparó directamente los datos datos de los presente autores con datos de flujo sanguíneo vaginal y cardiovascular generados en estudios preclínicos.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL[illegible] [illegible]AN
c. [illegible] 113
Teléf. [illegible] - MADRID

Se ha encontrado que la infusión de VIP tiene los siguientes efectos en el modelo en conejo de excitación sexual:

- El VIP exógeno (bolo intravenoso) induce aumentos dependientes de la concentración significativos del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2a). Estos aumentos son significativamente elevados por encima de los valores de flujo sanguíneo basal cuando se registran en la pared intra o extravaginal. El flujo sanguíneo vaginal aumentó significaticamente en 24,7 ± 3,6 ml/min/100 g de tejido con una administración intravenosa de VIP (60 µg/kg). El flujo sanguíneo permaneció elevado por encima del basal durante alrededor de 11 minutos después de la infusión. Dosis menores indujeron aumentos menores, por ejemplo 60,3 µg/kg elevaron el flujo sanguíneo en 7,5 ± 1,3 ml/min/100 g de tejido y el flujo sanguíneo se elevó durante 7 minutos después de la infusión.

- Las infusiones repetidas de dosis similares de VIP (intravenoso en intervalos de 30 minutos) inducen aumentos reproducibles significativos en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b).

- El VIP (intravenoso) aumenta significativamente el

MORENO
ALEMAN
113
MADRID

1384

ritmo cardiaco y reduce la presión sanguínea arterial media (véase la figura 3). A 6,0 µg/kg de VIP (intravenoso) se produjo una reducción significativa de la presión sanguínea arterial media de 13,2 ± 0,7 mm Hg y un aumento significativo del ritmo cardiaco de 16 ± 4 latidos por minuto.

Este modelo animal refleja directamente los datos clínicos observados con la infusión de VIP en voluntarias sanas, es decir, un aumento en el flujo sanguíneo vaginal, una presión sanguínea deprimida y un ritmo cardiaco elevado. Por lo tanto, este modelo puede utilizarse para investigar el (los) mecanismo(s) que subyace(n) a los cambios fisiológicos que aparecen durante la excitación sexual y para validar además los nuevos enfoques de la estimulación del flujo sanguíneo vaginal y por ello del tratamiento de los FSAD.

### 4.3 *Cambios inducidos por el VIP en el flujo sanguíneo vaginal mediante la estimulación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa*

Ottesen y colaboradores demostraron que el VIP induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal y en la lubricación en voluntarias sanas. Sin embargo, el mecanismo por el que

PAT[illegible] MORENO
[illegible] AV
[illegible] 113
[illegible] - MADRID

1385

el VIP ejerce este efecto no está claro. En la bibliografía hay muchos ejemplos de señalización de VIP mediante diferentes segundos mensajeros, incluyendo cGMP/guanilato ciclasa (Ashur-Fabian, 1999), monóxido de carbono/hemo oxigenasa (Fan, 1998) y cAMP/adenilato ciclasa (Schoeffer, 1985, Gu, 1992, Foda, 1995). Esto se ejemplifica por un reciente artículo que describe cómo los efectos relajantes de VIP en la arteria uterina pueden explicarse por la liberación de óxido nítrico (Jovanovic, 1998). De forma interesante, existen también evidencias de que NO/cGMP modula el VIP en la función urogenital masculina (Kim, 1994) y existen evidencias directas de que el tratamiento de cultivos celulares de músculos lisos vaginales humanos con VIP (0,5 µM) no consigue elevar los niveles de cAMP (Traish, 1999, ibidem).

En este estudio los presentes autores han mostrado que el VIP induce la vasorrelajación mediante la elevación de los niveles de cAMP intracelular. Realizando una serie de experimentos funcionales se ha medido el flujo sanguíneo y la relajación del músculo liso además de medir bioquímicamente las concentraciones de cAMP intracelular. Se ha utilizado forscolina, un activador de adenilato ciclasa, o un mimético de cAMP, para imitar los efectos de la activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa. El VIP

PATENTES [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. [illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

y la forscolina tienen efectos idénticos sobre los efectos fisiológicos de la excitación sobre el flujo sanguíneo vaginal y la relajación.

El VIP (20 µg/kg) y la forscolina (40 nmol/kg) inducen aumentos significativos del flujo sanguíneo vaginal, 13,2 y 12,7 ml/min/100 mg de tejido respectivamente (véase las figuras 2a y 4a). Estos cambios en la amplitud inducida por VIP y forscolina no eran significativamente diferentes. Estos aumentos son significativamente elevados por encima de los valores de flujo sanguíneo basal registrados en la pared intra- o extravaginal.

El VIP (0,1 µM) y la forscolina (10 µM) aumentaron ambos significativamente las concentraciones intracelulares de cAMP por encima de los niveles basales en tejido vaginal aislado (véase la figura 4b).

El VIP (0,1 µM) y la forscolina (10 µM) elevan las concentraciones basales de 276 nM en un 156% y un 238%, respectivamente. Las diferencias en estos porcentajes reflejan la diferencia de concentraciones de VIP y forscolina utilizados, por ejemplo el VIP a una concentración de 0,1 µM relaja la vagina aislada precontraída aproximadamente un 80%, mientras que la

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. [illegible], 13
Telf. [illegible] MADRID

forscolina 10 μM es suficiente para relajar completamente el tejido aislado.

Además, los presentes autores muestran que el VIP y la forscolina inducen la relajación en tejido vaginal aislado con valores de $CE_{50}$ de 18,8 ± 0,6 nM y 320 ± 20 nM respectivamente (véase la figura 4c).

Estos datos establecen que el VIP induce la vasorrelajación vaginal a través de la ruta cAMP/adenilato ciclasa, por ello este modelo puede utilizarse para investigar si la estimulación del nervio pélvico, es decir la excitación sexual, conduce a la liberación de VIP/activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa. Además, pueden investigarse los enfoques para estimular el flujo sanguíneo vaginal durante la excitación sexual, por ejemplo estimulando directa o indirectamente la señalización de cAMP.

### 4.4 *cAMP es el mediador de la vasorrelajación vaginal*

Los candidatos a neurotransmisor y segundo mensajero responsables de los aumentos del flujo sanguíneo vaginal durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. Hasta la fecha, los investigadores se han centrado en la ruta del óxido nítrico (NO)/cGMP. Según la

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]AN
c. [illegible] 113
Telé. [illegible] - MADRID

1388

presente invención, se ha demostrado que: 1) la ruta cAMP/adenilato ciclasa media los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal. 2) el VIP es un neurotransmisor endógeno liberado durante la excitación sexual y 3) el VIP liberado endógenamente induce efectos vasorrelajantes mediante la elevación de los niveles de cAMP.

El neurotransmisor responsable de la relajación de la pared vaginal está actualmente sin identificar. Los presentes autores han mostrado que el VIP es el neurotransmisor que se libera por estimulación del nervio pélvico y que cAMP media la vasorrelajación mediada por VIP. Los agentes que evitan el metabolismo de VIP o que estimulan directamente la señalización de cAMP, potencian los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal, por ejemplo inhibidores de NEP o inhibidores de $PDE_{cAMP}$, respectivamente (véanse las siguientes secciones).

En los estudios de los presente autores se ha encontrado que se puede excluir el papel del NO en la relajación vaginal inducida por VIP. A este respecto, hemos mostrado que un potente y selectivo inhibidor de PDE de tipo 5 no tiene efecto sobre los aumentos estimulados por nervio pélvico o inducidos por VIP en el flujo sanguíneo vaginal

[illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

(-5,3 ± 5,5% de cambio en el flujo sanguíneo a 60 µg/kg). Además, el inhibidor de PDE de tipo 5 tiene un efecto mínimo sobre las relajaciones inducidas por VIP o estimuladas por campo eléctrico (EFS) de músculo liso vaginal aislado (estimulaciones del 30% de relajaciones inducidas por VIP, véase la tabla 1).

Tabla 1: Estimulación de la relajación mediada por VIP de vagina de conejo aislada. Esta tabla ilustra el porcentaje de estimulación de la $CE_{50}$ para relajaciones mediadas por VIP de músculo liso vaginal precontraído (fenilefrina 1$\mu$M). Los inhibidores selectivos de $PDE_{cAMP}$ de tipos 1, 2, 3 y 4 potenciaron todos significativamente las relajaciones mediadas por VIP, mientras que un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 5 o un control de vehículo no tuvieron efecto sobre las relajaciones mediadas por VIP.

[illegible] MORENO
[illegible] MADRID

| Inhibidor de PDE a dosis selectiva | Porcentaje de estimulación de la relajación inducida por VIP |
|---|---|
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 1 | 210% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 | 130% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 3 | 220% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 4 | 160% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 5 | Sin efecto (30%) |
| Control de vehículo | Sin efecto |

Los presentes autores han mostrado que el VIP es también el neurotransmisor endógeno NANC (no adrenérgico, no colinérgico) parcialmente responsable de las relajaciones inducidas por EFS de músculo liso vaginal aislado. Una dosis elevada de inhibidor de óxido nítrico sintasa (L-NOARG, 300 µM) inhibe sólo el 50% de las relajaciones inducidas por EFS. Un inhibidor de NEP (1 µM) que evitará el metabolismo de VIP inducido por NEP, y que por lo tanto estimula la señalización de VIP, estimula la relajación NANC, que no depende de óxido nítrico, inducida por EFS. Han mostrado que tanto NO como VIP regulan el tono del músculo liso de la pared vaginal. Terapéuticamente será posible estimular las relajaciones del músculo liso vaginal

MORENO
AN
33
MADRID
Tel.

con agentes que estimulan la señalización mediada por NO/cGMP y/o VIP/cAMP.

4.5 *El flujo sanguíneo vaginal es estimulado por agentes farmacológicos que elevan directa o indirectamente los niveles de cAMP.*

Los candidatos a neurotransmisor y segundo mensajero responsables del aumento de flujo sanguíneo clitorídeo durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. En consonancia con la investigación actual sobre flujo sanguíneo vaginal, los trabajos han especulado y se han centrado en la ruta del óxido nítrico (NO)/cGMP. No hay informes de que el VIP juegue un papel en la mediación del flujo sanguíneo clitorídeo/congestión aunque se han visualizado neuronas que contienen VIP en tejido clitorídeo (Hauser-Kronberger et al, 1999).

En este estudio los presentes autores demuestran que:

1. La infusión de VIP aumenta el flujo sanguíneo clitorídeo.
2. La ruta de cAMP/adenilato ciclasa media los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo clitorídeo.
3. El VIP es un neurotransmisor clitorídeo endógeno que se libera durante la excitación sexual:

MORENO
113
MADRID

1. La infusión de VIP (60-200 µg/kg, bolo intravenoso) induce un aumento dependiente de la concentración del flujo sanguíneo clitorídeo (figura 5). Se observó un aumento del 115% del flujo sanguíneo clitorídeo después de una infusión intravenosa de 200 µg/kg de VIP. Esto era significativamente elevado respecto de las infusiones de control (Suero salino heparinizado).

2. Los efectos de VIP sobre el flujo sanguíneo clitorídeo pueden imitarse por una infusión de un mimético de cAMP, la forscolina (40 nmol/kg, bolo intravenoso, figura 5). Se observó un aumento del 156% del flujo sanguíneo clitorídeo después de una infusión intravenosa de forscolina, 40 nmol/kg. Esto era significativamente elevado respecto de las infusiones de control (Suero salino heparinizado). Obsérvese que la amplitud de la respuesta es similar a la inducida por VIP (200 µg/kg, bolo intravenoso) y comparable a las observadas en el flujo sanguíneo vaginal en las figuras 2 y 4.

Estos datos establecen que el VIP es capaz de aumentar el flujo sanguíneo clitorídeo/vasorrelajación y que esto puede imitarse por activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa.

4.6 *El flujo sanguíneo genital es estimulado por agentes*

MORENO
113
MADRID

*farmacológicos que elevan directa o indirectamente los niveles de cAMP.*

FSAD está asociado a, y puede dar como resultado, una reducción del flujo sanguíneo genital. Los enfoques potenciales para tratar esta enfermedad giran alrededor de la estimulación del flujo sanguíneo genital. Habiendo establecido que cAMP es el mediador de la vasorrelajación genital y que las elevaciones de cAMP que resultan del VIP liberado neuronalmente, los presentes autores creen que si se estimula la señalización de cAMP, como consecuencia aumentará el flujo sanguíneo genital, restableciendo así el flujo sanguíneo genital a niveles normales y tratando el FSAD.

### 4.6.1 Inhibidores de endopeptidasa neutra (NEP EC 3.4.24.11)

La NEP EC 3.4.24.11 metaboliza el VIP y por ello finaliza la actividad biológica mediada por VIP. Los inhibidores de NEP potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del VIP liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión genital.

No ha habido informes previos en la bibliografía sobre la

MORENO
ALEMAN
113
MADRID
Tel.

localización de NEP EC 3.4.24.11 o de su papel funcional en el tejido vaginal o de su papel en la excitación sexual.

Los inhibidores selectivos de NE EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 6).

Un inhibidor de NEP estimulaba el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal hasta un 53% comparado con los aumentos del control coincidente en el tiempo. Esta potenciación de las frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4 Hz), era dependiente de la dosis, por ejemplo 0,1 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 35,0 ± 7,6%, 0,3 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 42,6 ± 27,7% y 1,0 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 52,8 ± 32,5%. Los inhibidores de NEP no tuvieron efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (sin estimular). Por ello, los agentes de la presente invención estimulan la excitación potenciando la señalización de cAMP, más que induciendo la excitación en ausencia de deseo sexual, es decir por aumento directo de la señalización de cAMP.

Los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los

[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] - MADRID

aumentos inducidos por el VIP del flujo sanguíneo vaginal comparados con los controles de tiempo coincidente. A dosis submáximas de VIP (por ejemplo 6,0 µg/kg) hay una potenciación significativa tanto en el aumento del pico (95 ± 6%) como de la prolongación de la duración de la estimulación (alrededor de 140%, desde 7 hasta más de 17 minutos, véase la figura 7). Los inhibidores de NEP prolongan significativamente la duración de la elevación inducida por VIP del flujo sanguíneo vaginal cuando se proporcionan en combinación con una dosis de VIP que produce los aumentos de flujo máximos (aproximadamente un 80% de aumento en una duración de 11 a 20 minutos).

Los inhibidores de NEP a dosis clínicamente relevantes estimulan significativamente las relajaciones inducidas por VIP y mediadas por nervio en tejido aislado. La $CE_{50}$ de VIP se reduce significativamente de 18,8 ± 0,6 nM a 2,9 ± 0,3 nM en presencia de un inhibidor selectivo de NEP (1 µM). El efecto del inhibidor de NEP es dependiente de la concentración.

Se expresan el RNA mensajero y la proteína de NEP EC 3.4.24.11 y se han identificado en vagina humana y de conejo por análisis Northern y Western.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS [illegible]
MADRID
Teléf. [illegible]

1396

### 4.6.2 Inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE)

El cAMP es degradado por la PDE hidrolizante de cAMP, es decir, $PDE_{cAMP}$. Los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del cAMP liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No hay informes en la bibliografía sobre la localización de $PDE_{cAMP}$ o sobre un papel funcional de estas isoenzimas en tejido vaginal, o de un papel en la excitación sexual. Los presentes autores han mostrado, por perfiles de PDE de vagina humana y de conejo, que están presentes las siguientes isoenzimas de $PDE_{cAMP}$ 1, 2, 3, 4, 7 y 8. Los inhibidores de estas $PDE_{cAMP}$ representan agentes potenciales para estimular el flujo sanguíneo vaginal y/o relajar el músculo liso vaginal.

Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 a dosis clínicamente relevantes potencia significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 8). Un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 (500 µg/kg, intravenoso) estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal en 86,8 ± 21,9% comparado con el aumento observado durante el control

MORENO
ALEMAN
113
MADRID
Telé.

coincidente en el tiempo (a 4 Hz).

Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimuló significativamente la duración del aumento inducido por VIP (60 µg/kg) del pico de flujo sanguíneo vaginal por encima del 100% (medido a una amplitud del 50%, véase la figura 9). El inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimuló significativamente el aumento de pico del flujo sanguíneo inducido por la estimulación de VIP (en aproximadamente un 15 ± 3% [200 µg/kg])..

[Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2] estimuló significativamente la duración de los aumentos inducidos por VIP del pico del flujo sanguíneo vaginal por encima del 100% (medido a una amplitud del 50%, véase la figura 8). El inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula significativamente el aumento del pico del flujo sanguíneo inducido por estimulación del nervio pélvico (en aproximadamente un 15 ± 3% [200 µg/kg] a 4 Hz).

Los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ estimulan las relajaciones inducidas por VIP de músculo liso vaginal aislado precontraído (fenilefrina 1 µM, véase la tabla 1). Los inhibidores selectivos de $PDE_{cAMP}$ de tipos 1, 2, 3 y 4 potenciaban todos significativamente las relajaciones

[illegible] MORENO
[illegible]AN
[illegible]13
[illegible] ADRID
Telé. [illegible]

mediadas por VIP (210% a 76 nM, 130% a 8 nM, 220% a 3,4 µM y 160% a 686 nM de potenciación de los valores de VIP $CE_{50}$). Estos inhibidores se administraron a dosis que se sabían selectivas para el $PDE_{cAMP}$ de interés. El inhibidor selectivo de $PDE_{cGMP}$ de tipo 5 o el control de vehículo no tenían un efecto viable en las relajaciones mediadas por VIP.

### 4.6.3 Antagonistas del receptor de NPY Y1

El NPY ejerce una influencia inhibitoria sobre la vasorrelajación mediada por VIP y los antagonistas del receptor de NPY Y1 facilitarán el efecto vasorrelajante del VIP endógeno liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No existen informes en la bibliografía sobre la localización del receptor de NPY o de un papel funcional para estos receptores en tejido vaginal o un papel en la excitación sexual.

Los estudios de expresión del receptor de NPY han identificado por análisis Northern y Western que los subtipos de receptor de NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$ están presentes en vagina humana y de conejo.

PATENTES [illegible] MORENO [illegible] 113 [illegible] MADRID

Los inhibidores selectivos de NPY Y1 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 10). Un antagonista de NPY Y1 estimuló el aumento de pico del flujo sanguíneo vaginal hasta un 92% comparado con los aumentos del control coincidentes en el tiempo. Esta potenciación de las frecuencias submáximas de estimulación (por ejemplo 4 Hz) era dependiente de la dosis, por ejemplo, 0,01 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 15,8 ± 19,6%, 0,03 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 35,1 ± 17,17%, 0,10 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 60,1 ± 16,9% y 0,3 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 91,9 ± 27,4% (media ± s.e.m., n= 3). Los antagonistas de NPY Y1 no tuvieron efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (sin estimular). Esto refuerza la creencia de los presentes autores de que estimularán la excitación potenciando la señalización de cAMP, más que induciendo la excitación en ausencia de deseo sexual, es decir por aumento directo de la señalización de cAMP.

### 4.7 *Efectos de los agentes que estimulan cAMP o que aumentan el flujo sanguíneo vaginal sobre la presión sanguínea arterial media en conejo anestesiado.*

MORENO
MAN
113
MADRID
Telf.

En la búsqueda de una terapia oral para FSAD, es deseable que no haya efectos cardiovasculares adversos asociados, por ejemplo efectos sobre la presión sanguínea o sobre el ritmo cardiaco. En los estudios de los presentes autores se ha encontrado que las infusiones de VIP reducen significativamente la presión sanguínea arterial media (véase la figura 3) y aumentan significativamente el ritmo cardiaco. Por ello, en un agente altamente preferido, el agente no es VIP. La estimulación del nervio pélvico y los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ y de NEP, sin embargo, no tuvieron efecto sobre la presión sanguínea. A 6,0 µg/kg (intravenoso), el VIP produjo un aumento significativo del ritmo cardiaco de 16 ± 4 latidos por minuto. A dosis mayores tal como 60,0 µg/kg (intravenoso), el VIP produjo una reducción significativa en la presión sanguínea arterial media de 14,7 ± 1,37 mm Hg y esto se asoció a un aumento significativo del ritmo cardiaco de 111 ± 30 latidos por minuto, lo que aumentó entonces la presión sanguínea arterial media a 8,5 ± 1,4 mm Hg.

## COMPUESTOS ENSAYADOS

Se ensayaron una serie de los compuestos mencionados anteriormente según la presente invención y se encontraron eficaces según la presente invención, es decir, pueden

113
MADRID
Teléf.

actuar como $P_{cAMP}$ para tratar la FSD, en particular del FSAD.

Estos compuestos incluían:

El compuesto de fórmula Ia ("FIa") es 5-[4-(dietilamino)bencil]-1-metil-3-propil-6,7-dihidro-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona. El FIa puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0911333 (ejemplo 50 de éste).

El compuesto de fórmula II ("FII") es 9-(1-acetil-4-feinlbutil)-2-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona. El FII puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0771799 (ejemplo 100 de éste).

El compuesto de fórmula III ("FIII") es milrinone. El FIII es un producto comercialmente disponible.

El compuesto de fórmula IV ("FIV") es rolipram. El FIV es un producto comercialmente disponible.

El compuesto de fórmula V ("FV") es éster 3-[[[1-(2-carboxi-4-pentenil)ciclopentil]carbonil]amino]-1-etílico

MADRID
Telef.

del ácido ciclohexanocarboxílico. El FV puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0274234 (ejemplo 300 de éste).

El compuesto de fórmula VI ("FVI") es éster 3-[[[1-(2-carboxi-4-pentenil)ciclopentil]carbonil]amino] del ácido ciclohexanocarboxílico. El FVI puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0274234 (ejemplo 379 de éste).

En particular, los compuestos FIa, FII, FIII y FIV son inhibidores de PDE$_{cAMP}$. FIa es un I:PDEI, FII es un I:PDEII, FIII es un I:PDEIII y FIV es un I:PDEIV.

Los datos para estos compuestos se presentan anteriormente en las secciones de ejemplos anteriores, por ejemplo véase la tabla 1.

Como resulta evidente, estos inhibidores de PDE$_{cAMP}$ estimulan las relajaciones inducidas por VIP de tejido aislado.

El FII, que es un I:PDEII selectivo, estimula los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relevantes.

[illegible] MORENO [illegible] 113 [illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

El FII potencia también los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI son inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11.

Los datos presentados anteriormente en las secciones de ejemplos anteriores son para el FVI. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares para el FV.

Como resulta evidente, el FV y el FVI estimulan los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI potencian también los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI estimulan también las relajaciones inducidas por VIP y mediadas por el nervio de tejido aislado a dosis clínicamente relevantes.

[illegible] MORENO
[illegible] AN
113
MADRID
[illegible]

## ENSAYO ACE

## PREPARACION Y ENSAYO DE ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA SOLUBLE (ACE) A PARTIR DE CORTEZA RENAL PORCINA Y HUMANA

La actividad ACE soluble se obtiene a partir de la corteza renal y se ensaya por medición de la tasa de corte del sustrato de ACE Abz-Gly-para-nitro-Phe-Pro-OH para generar el producto fluorescente, Abz-Gly.

### 1. MATERIALES

Toda el agua está doblemente desionizada.

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 | Riñón humano | IIAM (Pennsylvania, EE.UU.) o Human Tissue Bank del Reino Unido (UK HTB) |
| 1.2 | ACE renal porcina | Sigma (A2580) |

1.3 Tampón de homogeneización 1

Manitol 100 mM y Tris 20 mM a pH 7,1

Se diluyen 2,42 g de Tris (Fisher T/P630/60) en 1 litro de agua y se ajusta el pH a 7,1 utilizando HCl 6 M a temperatura ambiente. Se añade a ésto 18,22 g de manitol (Sigma M-9546).

1.4 Tampón de homogeneización 2

Manitol 100 mM y Tris 20 mM a pH 7,1 y $MgCl_2.6H_2O$ 10 mM

PATRICIA MORENO
MADRID

(Fisher M0600/53)

Se añaden a 500 ml del tampón de homogeneización 1 (1.4) 1,017 g de $MgCl_2$.

1.5 Tampón Tris (tampón ACE)

Tris 50 mM y NaCl 300 mM a pH 7,4

Se preparan 50 ml de Tris 50 mM pH 7,4 (Sigma T2663) y 17,52 g de NaCl (Fisher S/3160/60) en agua hasta un volumen de 1000 ml.

1.6 Sustrato (Abz-D-Gly-para-nitro-Phe-Pro-OH) (Bachem M-1100)

Se almacena el sustrato ACE en forma de polvo a -20°C. Se prepara una disolución madre 2 mM por resuspensión suave del sustrato en tampón ACE, no debe agitarse en Vortex ni sonicarse. Se almacenan alícuotas de 400 µl de disolución madre 2 mM a -20°C durante un periodo de hasta un mes.

1.7 Producto total

Se incluyen en la placa muestras correspondientes al 100% de conversión de producto a sustrato para posibilitar la determinación del % de rendimiento del sustrato (véanse cálculos). Se genera el producto total por incubación de 1 ml de sustrato 2 mM con 20 µl de disolución madre de enzima durante 24 horas a 37°C.

1.8 Disolución de parada.

Se diluye EDTA 0,5 M (Promega CAS [6081/92/6] 1:250 en tampón ACE para preparar una disolución 2 mM.

PATRICIA RUSK MORENO
INGLES Y ALEMAN
[illegible] 113
Telf. [illegible] - MADRID

1.9 Dimetilsulfóxido (DMSO)

1.10 Cloruro de magnesio, $MgCl_2.6H_2O$ (Fisher M0600/53)

1.11 Placas de ensayo de fondo plano de 96 pocillos negras (Costar 3915 o Packard).

1.12 Topseal A (Packard 6005185).

1.13 Tubos de centrífuga

## 2. EQUIPAMIENTO ESPECIFICO

2.1 Centrífuga Sorvall RC-5B (rotor SS34 GSA, preenfriada a 4°C).

2.2 mezclador Miniprimer de Braun

2.3 Centrífuga Beckman CS-6R.

2.4 BMG Fluostar galaxy

2.5 Incubador de agitación Wesbart 1589.

## 3. PROCEDIMIENTOS

### 3.1 PREPARACION DE TEJIDOS

3.2 Se obtiene ACE humana de corteza renal utilizando un procedimiento adaptado de Booth, A.G. & Kenny, A.J. (1974) *Biochem J.*, 142, 575-581.

3.3 Se dejan descongelar los riñones congelados a temperatura ambiente y se extraen las cortezas de la médula.

[illegible] MORENO
[illegible] LEMAN
[illegible] 113
[illegible] - MADRID
Telf. [illegible]

3.4 Se corta finamente en láminas la corteza y se homogeneiza en aproximadamente 10 volúmenes de tampón de homogeneización 1 (1.4) utilizando un dispositivo Miniprimer de Braun (2.2).

3.5 Se añade cloruro de magnesio (1.1) (20,3 mg/g de tejido) al homogeneizado y se agita en baño de hielo y agua durante 15 minutos.

3.6 Se centrifuga el homogeneizado a 1.500 g (3.820 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman (2.3) antes de extraer el sobrenadante a un tubo de centrífuga nuevo y de descartar el sedimento.

3.7 Se centrifuga el sobrenadante a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Sorvall (2.1) y se descarta el sobrenadante.

3.8 Se extrae la capa rosa pálido de encima del sedimento restante y se resuspende en tampón de homogeneización 2 (1.5) (5 ml de tampón por 1 g de tejido).

3.9 Se centrifuga la suspensión a 2.200 g (4.630 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman antes de descartar el sedimento.

3.10 Se centrifuga el sobrenadante a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos utilizando la centrífuga Sorvall y se descarta el sobrenadante.

3.11 Se resuspende el sedimento final en tampón de homogeneización 2 (0,5 ml de tampón por 1 g de tejido). Se

MORENO
Y ALEMAN
113
MADRID
Telé

obtiene una suspensión homogénea utilizando Miniprimer de Braun. Esta se congela a continuación en alícuotas de 100 µl para ensayar la actividad NEP.

## 4.0 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ACE

Se mide la actividad de la ACE previamente dispuesta en alícuotas por su capacidad de cortar el sustrato peptídico específico de ACE.

Se descongela ACE porcina (1.2) y se resuspende en tampón ACE (1.6) a 0,004 U/µl, que se vuelve a congelar en alícuotas de 50 µl.

4.1 Se prepara una disolución de DMSO al 4%/tampón ACE (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón ACE).

4.2 Se dejan las disoluciones madre de sustrato (1.7), producto total (1.8) y enzima (1.1, 1.2 y 1.3) en hielo para descongelar.

4.3 Se añaden 50 µl de disolución de DMSO al 4%/tampón ACE a cada pocillo.

4.4 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:100 para preparar una disolución 20 µM. Se añaden 100 µl de sustrato 20 µM a cada pocillo (concentración final en el ensayo 10 µM).

4.5 Se añaden 50 µl de un intervalo de diluciones de

PATENTES ... MORENO
ING. ... ALEMAN
... 113
MADRID
Teléf. ...

enzimas para iniciar la reacción (habitualmente se utilizan 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200). Se añaden 50 µl de tampón ACE a los pocillos blanco.

4.6 Se diluye el producto total 2 mM 1:200 para preparar una disolución 10 µM. Se añaden 200 µl de producto 10 µM a los cuatro primeros pocillos de una placa nueva.

4.7 Se incuban las placas a 37°C en incubador de agitación durante 60 minutos.

4.8 Se para la reacción por adición de 100 µl de EDTA 2 mM en tampón ACE y se incuba a 37°C en un incubador de agitación durante 20 minutos antes de leer en un BMG Fluostar Galaxy (ex320, em420).

## 5. ENSAYOS DE INHIBICION DE ACE

5.1 Se dejan las disoluciones madre de sustrato, producto total y enzima en hielo para descongelar.

5.2 Se preparan disoluciones madre del compuesto con DMSO al 100% y se diluyen 1:25 en tampón ACE proporcionando una disolución de DMSO al 4%. Todas las demás diluciones se llevan a cabo en disolución de DMSO al 4% tampón ACE (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón ACE).

5.3 Se añaden 50 µl de compuesto por duplicado a la placa de 96 pocillos y se añaden 50 µl de DMSO al 4%/tampón ACE a los pocillos de control y a los blancos.

PATRICIA KOCH MORENO
ING ... GUZMAN
... Cartagena, 113
Telf. ... - MADRID

5.4 Las etapas 5.2 y 5.3 pueden llevarse a cabo manualmente o utilizando robots multisonda de Packard.

5.5 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:100 en tampón ACE preparando una disolución 20 μM (concentración final 10 μM en el ensayo) (110 μl de sustrato 2 mM añadidos a 10,89 ml de tampón es suficiente para una placa).

5.6 Se diluye la disolución madre de enzima en tampón ACE, según lo determinen las comprobaciones de actividad (4.0).

5.7 Se diluye la disolución madre de producto total 2 mM 1:200 en tampón ACE para preparar una disolución 10 μM. Se añaden 200 μl a los cuatro primeros pocillos de una placa por separado.

5.8 Se diluye la disolución madre de EDTA 0,5 mM 1:250 para preparar una disolución madre 2 mM (44 μl de EDTA a 10,96 ml de tampón ACE).

5.9 Se añade a cada pocillo de la placa de 96 pocillos los siguientes reactivos:

PATENTES ... MORENO
ING. S Y LIMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. ... - MADRID

Tabla 1: Reactivos añadidos a la placa de 96 pocillos.

| | Compuest /DMSO | Tampón Tris | Sustrato | Enzima ACE | Producto total |
|---|---|---|---|---|---|
| Muestras | 2 $\mu$l de compuesto | 50 $\mu$l | 100 $\mu$l | 50 $\mu$l | Nada |
| Controles | 2 $\mu$l de DMSO | 50 $\mu$l | 100 $\mu$l | 50 $\mu$l | Nada |
| Blancos | 2 $\mu$l de DMSO | 100 $\mu$l | 100 $\mu$l | Nada | Nada |
| Totales | 2 $\mu$l de DMSO | Nada | Nada | Nada | 200 $\mu$l |

5.10 Se añaden 50 $\mu$l de la concentración mayor de cada compuesto utilizado en el ensayo por duplicado a la misma placa de 96 pocillos de los totales (5.7). Se añaden 150 $\mu$l de tampón ACE para determinar cualquier fluorescencia de un compuesto.

5.11 Se inicia la reacción por adición de la enzima ACE antes de incubar a 37°C durante 1 hora en un incubador de agitación.

5.12 Se para la reacción por adición de 100 $\mu$l de EDTA 2

[illegible] MORENO
[illegible]
[illegible] 13
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

mM y se incuba a 37°C durante 20 minutos en un incubador de agitación antes de leer en el BMG Fluostar Galaxy (ex320/em420).

## 6. CALCULOS

Se determina la actividad de la enzima ACE en presencia y ausencia del compuesto y se expresa como un porcentaje.

FU= unidades de fluorescencia

(i) % de actividad del control (rendimiento de la enzima)

$$\frac{\text{FU medias de los controles - FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales - FU medias de los blancos}} \times 100$$

(ii) % de actividad con inhibidor

$$\frac{\text{FU medias del compuesto - FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales - FU medias de los blancos}} \times 100$$

(iii) Actividad expresada como % del control:

$$\frac{\text{\% actividad con inhibidor}}{\text{\% actividad del control}} \times 100$$

MORENO
Y LEMAN
113
MADRID
Telef.

o $$\frac{\text{FU medias del compuesto-FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los controles-FU medias de los blancos}} \times 100$$

(iv) % inhibición = 100 - % control

(v) Para los compuestos fluorescentes las FU medias de los blancos que contienen compuesto (5.10) se deducen de las FU medias de los valores del compuesto utilizados para calcular el % de actividad.

Se ajusta una curva de dosis-respuesta sigmoidal para el % de actividades (% de control) frente a la concentración de compuesto y se calculan los valores de CI50 utilizando el ajuste de curvas LabStats en Excel.

## CONCLUSIONES

Los presentes autores han desarrollado un modelo animal que imita la respuesta de excitación fisiológica obervada durante la excitación sexual femenina y que refleja directamente los datos clínicos obtenidos en voluntarias humanas. El modelo utiliza tecnologías de láser Doppler para registrar pequeños cambios en el flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo inducidos por la estimulación del nervio pélvico o por neurotransmisores vasoactivos. Durante

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

la excitación sexual, existe un aumento del flujo sanguíneo genital resultante del aumento de inervación del nervio pélvico. El aumento estimulado por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo observado en el modelo animal representa los efectos vasculares endógenos observados durante la excitación sexual femenina, es decir, la congestión. Por lo tanto, este modelo puede utilizarse en primer lugar para identificar los mecanismos implicados en la regulación del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo y, en segundo lugar, para validar nuevos enfoques para la estimulación del flujo sanguíneo genital.

Este estudio ha utilizado exitosamente una combinación de técnicas in vivo, in vitro y bioquímicas para mostrar que el VIP media el flujo sanguíneo genital y para identificar al cAMP como el mediador/segundo mensajero que regula la vasorrelajación genital (y la relajación de la pared vaginal). Utilizando este modelo animal, se ha demostrado que la infusión de VIP induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo. Utilizando un inhibidor del metabolismo de VIP (por ejemplo un inhibidor NEP EC3.4.24.11) se ha demostrado también que los aumentos del flujo sanguíneo genital observados durante la estimulación del nervio pélvico (es decir excitación sexual) están mediados por el VIP. Se ha mostrado que los aumentos

PAT... MORENO
ING. ... ALEMAN
C. ... ona, 113
Telf. ... 90 - MADRID

mediados por el VIP en el flujo sanguíneo genital resultan de la elevación de los niveles de cAMP de tejido, mientras que anteriormente se había mostrado que el VIP aumentaba el flujo sanguíneo vaginal en voluntarias sanas, pero el mecanismo celular no estaba identificado. Además, se ha demostrado que el flujo sanguíneo genital puede estimularse directamente con un mimético de cAMP o indirectemente elevando las concentraciones de cAMP con un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 o con un antagonista de receptor de NPY Y1.

La causa principal de los FSAD es una reducción del flujo sanguíneo genital y esta se manifiesta como una reducción de la congestión vaginal, labial y clitorídea. El tratamiento de mujeres con FSAD es factible restableciendo la respuesta de excitación sexual normal. Esto puede conseguirse estimulando el flujo sanguíneo genital. El enfoque de los presentes autores para el tratamiento de los FSAD será estimular el flujo sanguíneo genital potenciando así la congestión vaginal/lubricación y la sensibilidad/congestión clitorídea por potenciación directa o indirecta de la señalización de cAMP endógeno, por ejemplo con un inhibidor de NEP (EC 3.4.24.11), un inhibidor de PDE hidrolizante de cAMP o un antagonista del receptor de NPY. Esto tendrá el efecto genérico de

PAT[illegible] MORENO
[illegible] LEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

restablecer o potenciar la respuesta de excitación normal sin efectos secundarios cardiovasculares. Se potenciará la excitación sexual/congestión, más que inducirla simplemente en ausencia de estímulo sexual, que puede ser el caso con algunos agentes vasoactivos administrados exógenamente, por ejemplo el VIP.

En resumen, por lo tanto, la presente invención se refiere, entre otras cosas, a:

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD.

Un procedimiento de tratamiento de una hembra (como

MACH MORENO
Y ALEMAN
113
MADRID
Telé

una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Para estas realizaciones el agente es preferiblemente al menos uno o más de: un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

En una realización altamente preferida, la presente invención se refiere a, entre otras cosas:

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo suministrado oralmente el citado agente.

El uso de un agente en la fabricación de un

PATRICIA KOCH MORENO
ING[illegible] Y [illegible]
[illegible] 113
C [illegible] - MADRID
Telef. [illegible]

medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, y siendo suministrado oralmente el citado agente.

Un procedimiento de tratamiento de una hembra (tal como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo suministrado oralmente el citado agente.

Para estas realizaciones, el agente es preferiblemente uno o más de: un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

En una realización adicional altamente preferida, la presente invención se refiere, entre otras cosas, a:

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD,

[illegible] MADRID

comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

Un procedimiento de tratamiento de una hembra (tal como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

Para estas realizaciones, el agente es preferiblemente

Teléf. 519 ... - MADRID

uno o más de: un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

En otra realización altamente preferida, la presente invención se refiere, entre otras cosas, a:

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, siendo suministrado oralmente el citado agente y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, siendo suministrado oralmente el citado agente y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

Un procedimiento de tratamiento de una hembra (tal como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD),

[illegible] MORENO
[illegible] Y AL[illegible]
[illegible], 113
[illegible] - MADRID

comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, estando suministrado oralmente el citado agente y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

Para estas realizaciones, el agente es preferiblemente uno o más de: un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente como referencia. Diversas modificaciones y variaciones de los procedimientos y del sistema descritos en la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin salirse del alcance y espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención se describe en conexión con realizaciones preferidas específicas, debe comprenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. Es más, están previstas diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en bioquímica y biotecnología o campos

[illegible] MORENO [illegible] 113 [illegible] MADRID

1422

relacionados, dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

## REFERENCIAS DEL TEXTO GENERAL

Ashur-Fabian, O., Perl. O., Lilling. G., et al., (1999) SNV, a lipophilic superactive VIP analogue, acts through cGMP to promote neuronal survival. *Peptides*, 20, 629-633.

Berman, J.R., Berman, L. & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: Incidence, pathophysiology, evaluation and treatment options. *Urology*, 54, 385-391.

Berman, J., Goldstein, I., Werbin, T. et al., (1999a). Double blind placebo controlled study with crossover to assess effect of sildenafil on physiological parameters of the females sexual response. *J. Urol.*, 161, 805.

*Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV*, American Psychiatric Association, Washington DC. 1987, pág. 493-518.

Fan, Y.P., Chakder, S. & Ratton, S. (1999). Inhibitory effect of zinc protoporhyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal

MADRID

polypeptide and other receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 468-474.

Foda, H.D., Sharaf, H.H., Absood, A. et al. (1995). Pituitary adenilate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides*, **16**, 1057-1061.

Frank, E., Anderson, C. & Rubinstein, D. (1978). Frequency of sexual dysfunction in "normal" couples. *N. Engl. J. Med.*, **229**, 111-115.

Goldstein, I. & Berman, J.R: (1998). Vasculogenic female sexual dysfunction: vaginal engorgement and clitoral erectile insufficiency syndromes. *Int. J. Impot. Res.*, **10**, S84-S90.

Gu, Z.F., Jensen, R.T. & Matton, P.N. (1992). A primary role for protein kinase A in smooth muscle relaxation induced by adrenergic agonists and neuropeptides. *Am. J. Physiol.*, **263**, G360-G364.

Hauser-Kronberger, C., Cheung, A., Hacker, G. et al. (1999). Peptidergic innervation of the human clitoris. *Peptides*, **20**, 539-543.

Hoyle, C.H.V., Stones, R.W., Robson, T. et al. (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide containing nerves. *J. Anat.*, 188, 633-644.

Ingenhoven, N. & Beck-Sickinger, A.G. (1997). Fluorescent labelled analogues of neuropeptide Y for the characterisation of cells expressing NPY receptor subtypes. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, 17, 407-418.

Jovanovic, A., Jovanovic, S., Tulic, I. et al (1998). Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Human. Reprod.*, 4, 71-76.

Kaplan, H.S. (1974). The New Sex Therapy. Londres. Bailliere Tindall.

Kaplan, S.A., Reis, R.B., Kohm, I.J. et al. (1999). Safety and efficacy of sildenafil in postmenopausal women with sexual dysfunction. *Urology*, 53, 481-486.

Kim, Y.C., Choi, H.K., Ahn, Y.S., et al. (1994). The effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on rabbit cavernosal smooth muscle contractility. *J. Androl.*, 15,

MORENO
MAN
13
MADRID

392-739.

Laan, E. & Everaerd, W. (1988). Physiological measures of vaginal vasocongestion. *Int. J. Impot. Res.*, 10, S107-S110.

Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, 10, S104-S106.

Levin, R.J. (1980). The physiology of sexual function in women. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 7, 213-252.

Levin, R.J. (1991). VIP, vagina, clitoral and preurethral glans: An update on female genital arousal. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 98, 61-69.

Levin, R.J. (1992). The mechanisms of human females sexual arousal. *Ann. Rev. Sex. Res.*, 3, 1-48.

Levin, R.J. & Wagner, G. (1986). TRH and vaginal blood flow-effects in conscious women and anaesthetised sheep. *J. Physiol.*, 373, 83p.

Lunberg, J.M., Modin, A. & Malmstrom, R.E. (1996), Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists.

MORENO
...AN
113
...ADRID
Telé...

*Trends Pharmacol. Sci.*, 17, 301-304.

Masters, W.H., Johnson, V.E. *Human Sexual Response*, Little, Brown: Boston, 1996.

Ottesen, B., Gerstenberg, T., Ulrichsen, H. et al. (1983). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases vaginal blood flow and inhibits smooth muscle activity in women. *Eur. J. Clin. Invest.*, 13, 321-324.

Ottesen, B., Wagner, G. & Fahrenkrug, J. *Peptide innervation of the sexual organs*. En: Handbook of Sexology, vol. 6, The Pharmacological and Endocrinology of Sexual Function, Sitsen, J.M.A. (ed). Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1988), capítulo 4, pág. 66-97.

Ottensen, B., Pedersen, B., Nielsen, J. et al. (1987). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides*, 8, 797-800.

Park, K., Goldstein, I., Andry, C., et al (1997). Vasculogenic female sexual dysfunction: the hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. *Int. Impotence Res.*, 9, 27-37.

PATENTES ... MORENO
ING ... LUJAN
... 113
C ... MADRID
Telef. 51...

Rosen, R., Taylor, J., Leiblum, S. et al. (1993). Prevalence of sexual dysfunction in women: results of a survey of 329 women in an outpatient gynecological clinic. *J. Sex. Marital. Ther.*, 19, 171-188

Schiavi, R.C. & Seagraves, R.T. (1995). The biology of sexual function. *Psychiat. Clin. North. Am.*, 18, 7-23.

Schoeffter, P. & Stoclet, J.C. (1985). Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 109, 275-279.

Serradeil-Le Gal, C., Valette, G. Rouby, P.E. et al. (1995). SR 120819A, an orally active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Letters*, 3, 192-196.

Sjoberg, I. (1992). The vagina: Morphological, functional and ecological aspects. *Acta Obst. Gynecol. Scand.*, 71, 84-85.

Spector, I.P. & Carey, M.P. (1990). Incidence and prevalence of sexual dysfunctions: a critical review of empirical literature. *Arch. Sex. Behav.*, 19, 389-408.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGENIEROS [illegible]
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

Wagner, G. (1992). Aspects of genital physiology and pathology. *Sem. Neurol.*, **12**, 87-97.

Werbin, T., Salimpour, P., Berman, L, et al (1999). Effect of sexual stimulation and age on genital blood flow in women with sexual stimulation. *J. Urol.*, **161**, 688.

Wincze, J.P., Albert, A. & Bansal, S. (1993). Sexual arousal in diabetic females: Physiological and self-report measures. *Arch. Sex Behav.*, **22**, 587-601.

Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M. et al (1995). Subtype selectivity and antagonist profile of nonpeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 143-9.

REFERENCIAS PARA LA SECCION PDE

1. Han, P., Fletcher, C.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Yaremko, L.M., Michaeli, T. Assignemt of the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3 and of the human PDE7A gene to chromosome 8q13. Genomics 48: 275-276, 1998.

2. Michaeli, T., Bloom, T.J., Martins. T., Loughney, K., Ferguson, K., Riggs, M., Rodgers, L. Beavo, J.A., Wigler, M.: Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phophodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem., 268: 12925-12932, 1993.

3. Milatovich, A., Bolger, G., Michaeli, T., Francke, U.: Chromosome localization of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse. Somat. Cell. Molec. Genet. 20:75-86, 1994.

4. Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K., Loughney, K.: Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3-prime, 5-prime-cyclic nucleotide phophodiesterase. Gene 191: 89-95, 1997.

REFERENCIAS PARA LA SECCION NEP

1. Barker, P.E., Shipp, M.A., D'Adamio, L., Masteller, E.L., Reinherz, E.L. The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3(q21-q27). J. Immun. 142:283-287, 1989.

[illegible] ALEMAN [illegible] 113 [illegible] MADRID

1430

2. D'Adamio, L., Shipp, M.A., Masteller, E.L., Reinherz, E.L.: Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5-prime untranslated regions. Proc. Nat. Acad. Sci. 86:7103-7107, 1989.

3. Letarte, M., Vera, S., Tran, R., Addis, J.B.L., Onizuka, R.J., Quackenbush, E.J., Jongheel, C.V., McInnes, R.R:: Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. J. Exp. Med. 168:1247-1253, 1988.

4. Shipp, M.A., Vijayaraghavan, J., Schmidt, E.V., Masteller, E.L., D'Adamio, L., Hersh, L.B., Reinherz, E.L.: Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. 86:297-301, 1989.

5. Tran-Paterson, R., Willard, H.F., Letarte, M.: The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 3.4.24.11) gene is located on human cromosome 3. Cancer Genet. Cytogenetic. 42:129-134, 1989.

[illegible] Y ALEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

1431

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPY

1. Allen, J.M., Bloom, S.R.: Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8:1-8, 1986.

2. Bahary, N., Zorich, G., Pachter, J.E., Leibel, R.L., Friedman, J.M.: Molecular genetic linkage maps of mouse chromosomes 4 and 6. Genomics 11:33-47, 1991.

3. Baker, E., Hort, Y.J., Ball, H., Sutherland, G.R., Shine, J., Herzog, H.: Assignment of the human neuropeptide Y gene to chromosome 7p15.1 by nonisotopic in situ hybridization. Genomics 26:163-164, 1995.

5. Carr, L.G., Foroud, T., Bice, P., Gobbert, T., Ivashina, J., Edenberg, H., Lumeng. L., Li, T.K.: A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. Alcohol Clin. Exp. Res. 22:884-887, 1998.

5. Dockray, G.J.: Neuropeptide Y: in search of a function. Neurochem. Int. 8:9-11, 1986.

6. Erickson, J.C., Clegg., K.E., Palmiter, R.D.: Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. Nature 381: 415-421, 1996.

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
ING. [illegible] MADRID
Telé. 519 [illegible]

PubMed ID: 8632796.

7. Erickson, J.C., Hollopeter, G., Palmiter, R.D.: Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274: 1704-1706, 1996.

8. Karvonen, M.K., Pesonen, U., Koulu, M., Niskanen, L., Laakso, M., Rissanen, A., Dekker, J.M., t'Hart, L.M., Valve, R., Uusitupa, M.I.: Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. Nature Med. 4:1434-1437, 1998.

9. Maccarrone, C., Jarrott., B.; Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8:13-22, 1986.

10. Meisler, M.H., Spence, J.E., Dixon, J.E., Caldwell, R.M., Minth, C.D., Beaudet, A.L.: Exclusion of close linkage between the loci for cystic fibrosis and neuropeptide Y on human cromosome 7. Cytogenet. Cell Genet. 44:175-176, 1987.

11. Minth, C.D., Andrews, P.C., Dixon, J.E.: Characterization, sequence and expression of the cloned human neuropeptide Y gene. J. Biol. Chem. 261:11974-11979,

[illegible] MORENO
INGLÉS Y [illegible]AN
c [illegible] 113
Teléf. [illegible] - MADRID

1986.

12. Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M., Dixon, J.E.: Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptidase tyrosine. Proc. Nat. Acad. Sci. 81:4577-4581, 1984.

13. Takeuchi, T., Gumucio, D., Eddy, R., Meisler, M., Minth, C. Dixon, J., Yamada, T., Shows, T.: Assignment of the related pancreatic polypeptide (PPY) and neuropeptide Y (NPY) genes to regions on human chromosomes 17 and 7. (Resumen) Cytogenet. Cell. Genet. 40:759 sólo, 1985.

14. Takeuchi, T., Gumucio, D.L., Yamada, T., Meisler, M.H., Minth, C.D., Dixon, J.E., Eddy, R.E., Shows, T.B.: Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. J. Clin. Invest. 77:1038-1041, 1986.

15. Terenghi, G., Polak, J.M., Hamid, Q., O'Brien, E., Denny, P., Legon, S., Dixon, J., Minth, C.D., Palay, S.L., Yasargil, G., Chan-Palay, V.: Localization of neuropeptide Y mRNA in neurons of human cerebral cortex by means of in situ hybridization with a complementary RNA probe. Proc. Nat. Acad. Sci. 84:7315-7318, 1987.

16. Thiele, T.E., Marsh, D.J., Ste. Marie, L., Bernstein, O.L., Palmiter, R.D.: Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. Nature 396:366-369, 1998.

17. Uusitupa, M.I.J., Karvonen, M.K., Pesonen, U., Koulu, M.: Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism. Ann. Med. 30:508-510, 1998.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPYR1

1. Herzog, H., Baumgartner, M., Vivero, C., Selbie, L.A., Auer, B., Shine, J.: Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor. J. Biol. Chem. 268:6703-6707, 1993.

2. Herzog, H., Darby, K., Ball, H., Hort, Y., Beck-Sickinger, A., Shine, J.: Overlapping gene stucture of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests coordinate transcriptional regulation, Genomics 41:315-319, 1997.

3. Herzog, H., Hort, Y.J., Ball, H.J., Hayes, G., Shine,

[illegible] MADRID

J., Selbie, L.A.: Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. Proc. Nat. Acad. Sci. 89:5974-5798, 1992.

4. Larhammar, D., Blomqvist, A.G., Yee, F., Jazin, E., Yoo, H., Whalestedt, C.: Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. J. Biol. Chem. 267:10935-10938, 1992.

5. Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson, D.A.: Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41:498-500, 1997.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPYR2

1. Ammar, D.A., Eadie, D.M., Wong, D.J., Ma, Y.-Y., Kolakowski, L.F. Jr., Yang-Feng, T.L., Thompson, D.A.: Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide Y receptor gene. Genomics 38:392-398, 1996.

2. Gerald, C., Walker, M.W:, Vaysse, P., J.-J., He, C., Brancheck, T.A., Weinsahnk, R.L.: Expression cloning and

PATRICIA [illegible]
INGL[illegible] Y [illegible]
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

1436

pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. J. Biol. Chem. 270: 26758-26761, 1995.

3. Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson, D.A.: Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

4. Rose, P.M., Fernandes, P., Lynch, J.S., Frazier, S.T., Fisher, S.M., Kodukula, K., Kienzle, B., Seethala, R.: Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. J. Biol. Chem. 270:22661-22664, 1995.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VIP

1. Bodner, M., Fridkin, M. Gozes, I.: Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3548-3551, 1985.

2. Gotoh, E., Yamagami, T., Yamamoto, H., Okamoto, H.: Chromosomal assignment of human VIP/PHM-27 gene to 6q26-q27 region by spot blot hybridization and in situ

PATRICIA [illegible] MORENO
Telé.
MADRID

hybridization. Biochem. Int. 17:555-562, 1988.

3. Gozes, I., Avidor, R., Yahav, Y., Katznelson, D. Croce, C.M., Huebner, K.: The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21-6qter. Hum. Genet. 75:41-44, 1987.

4. Gozes, I., Nakai, H., Byers, M., Avidor, R., Weinstein, Y., Shani, Y., Shows, T.B.: Sequential expression in the nervous system of C-MYB and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24. Somat. Cell. Molec. Genet. 13:305-313, 1987.

5. Heinz-Erian, P., Dey. R.D., Flux, M. Said, S.I.: Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. Science 229: 1407-1408, 1985.

6. Itoh, N., Obata, K., Yanaihara, N., Okamoto, H.: Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature 304:547-549, 1983.

7. Linder, S., Barkhem, T., Norberg, A., Persson, H., Schalling, M., Hokfelt, T., Magnusson, G.: Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal

PATRICIA ROJO MORENO

peptide precursor. Proc. Nat. Acad. Sci. 84:605-609, 1987.

8. Omary, M.B., Kagnoff, M.F.: Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line. Science 238: 1578-1581, 1987.

REFERENCIAS PARA LA SECCION AC

1. Parma, J., Stengel, D., Gannage, M.-H., Poyard, M., Barouki, R., Hanoune, J.: Sequence of a human brain adenylyl cyclase partial cDNA: evidence for a consensus cyclase domain. Biochem. Biophys. Rs. Commun. 179:455-462, 1991.

2. Stengel, D., Parma, J., Gannage, M.-H., Roeckel, N., Mattei, M.-G., Barouki, R., Hanoune, J.: Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. Hum. Genet. 90:126-130, 1992.

REFERENCIAS PARA LA SECCION VPAC1

1. Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Darmoul, D., Maoret, J.-J., Carrero, I., Ogier-Denis, E., Laburthe, M.: Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNS encoding proteins with different N-terminal

KOCH MORENO
Y ALEMAN
113
MADRID

domains. Biochem. Biopys. Res. Commun. 200:769-776, 1994.

2. Hashimoto, H., Nishino, A., Shintani, N., Hagihara, N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Yamamoto, K., Matsuda, T., Ishihara, T., Nagata, S., Baba, A.: Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VPAC-1) receptor. Genomics 58:90-93, 1999.

3. Libert, F., Passage, E., Parmentier, M., Simons, M.-J., Vassart, G., Mattei, M.-G., Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonine receptor. Genomics 11: 225-227, 1991.

4. Sreedharan, S.P., Huang, J.-X., Cheung, M.-C., Goetzl, E.J.: Structure, expression and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. Proc. Nat. Açad. Sci. 92:2939-2943, 1995.

5. Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Huang, J.-X., Goetzl, E.J.: Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193:546-553, 1993.

6. Sreedharan, S.P., Robichon, A., Peterson, K.E., Goetzl, E.J.: Cloning and expression of the human vasoactive

PATRICIA KOCH MORENO
ALEMAN
MADRID

intestinal peptide receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. 88:4986-4990, 1991.

7. Vassart, G.: Personal Communication. Bruselas, Bélgica, 1-15-1992.

8. Wenger, G.D.: Personal Communication, Columbus, Ohio, 8-3-1993.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VPAC2

1. Adamou, J.E., Aiyar, N., Van Horn, S., Elshourbagy, N.A.: Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 209:385-392, 1995.

2. MacKay, M., Fantes, J., Scherer, S., Boyle, S., West, K., Tsui, L.-C., Belloni, E., Lutz, E., Van Heyningen, V., Harmar, A.J.: Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. Genomics 37:345-353, 1996.

3. Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., Goosens, J.-F., De Neef, P., Waelbroeck, M. Robberecht, P.:

PATENTA [illegible] MORENO
ING [illegible]
C. [illegible]
Telef. [illegible] - MADRID

Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochem. Biophy. Res. Commun. 205:1617-1624, 1994.

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 [illegible] - MADRID

1442

**LISTADO DE SECUENCIAS**

**1. NEP (EC 3.4.24.11)**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSMRNAEN 3181 pb mRNA PRI 12-sep-1993 |
| DEFINICION | mRNA humano para encefalinasa (EC 3.4.24.11) |
| ACCESO | X07166 |
| NID | g34757 |
| VERSION | X07166.1 GI: 34757 |
| PALABRAS CLAVE | encefalinasa, metaloproteína, endopeptidasa neutra |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 3181) |
| AUTORES | Malfroy, B., Kuang, W.J., Seeburg, P.H., Mason, A.J. y Schofield, P.R. |
| TITULO | Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). |
| REVISTA | FEBS. Lett. 229 (1), 206-210 (1998) |
| MEDLINE | 88152222 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |

PATRICIA ROCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telf. 51? ?? ?? - MADRID

1443

source 1...3181
/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/tissue_type="placenta"
/clone_lib="lambda gt10"
/clone="lambda H7"

CDS 18..2249
/note="enkephalinase (AA 1-743)"
/codon_start=1
/protein_id="CAA30157.1"
/db_xref="PID:g34758"
/db_xref="GI:34758"
/db_xref="SWISS-PROT:P08473"
/translation="MDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYAT
YDDGICKSSDCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKYACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDI
LRDELEVVLKDVLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINESAIDSRGGEPLLKLLPDIYGW
PVATENWEQKYGASWTAEKALAQLNSKYGKKVLINLFVGTDDKNSVNHVIHIDQPRLG
LPSRDYYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDENQLALEMNKVMELEKEI
ANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSLEINGKPFSWLNFTNEIMSTVNISITNE
EDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTYKESRNAFRKALY
GTTSETATWRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDD
LTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNKLNNEYLELNYKEDEYFENIIQNL
KFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSL
NYGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSASNFKEQSQCMVYQYGNFSW
DLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLGQAYRAYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQLFFLN
FAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEKKC
RVW"

misc_feature 3073..3078
/note="poly A signal"

5 RECUENTO DE BASES 1055 a, 582 c, 657 g, 887 t

ORIGEN

```
  1 gcaagtcaga aagtcagatg gatataactg atatcaacac tccaaagcca aagaagaaac
 61 agcgatggac tccactggag atcagcctct cggtccttgt cctgctcctc accatcatag
121 ctgtgacaat gatcgcactc tatgcaacct acgatgatgg tatttgcaag tcatcagact
181 gcataaaatc agctgctcga ctgatccaaa acatggatgc caccactgag ccttgtacag
```

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

1444

```
 241 acttttcaa  atatgcttgc ggaggctggt tgaaacgtaa tgtcattccc gagaccagct
 301 cccgttacgg caactttgac attttaagag atgaactaga agtcgttttg aaagatgtcc
 361 ttcaagaacc caaaactgaa gatatagtag cagtgcagaa agcaaaagca ttgtacaggt
 421 cttgtataaa tgaatctgct attgatagca gaggtggaga acctctactc aaactgttac
 481 cagacatata tgggtggcca gtagcaacag aaaactggga gcaaaaatat ggtgcttctt
 541 ggacagctga aaaagctatt gcacaactga attctaaata tgggaaaaaa gtccttatta
 601 atttgtttgt tggcactgat gataagaatt ctgtgaatca tgtaattcat attgaccaac
 661 ctcgacttgg cctcccttct agagattact atgaatgcac tggaatctat aaagaggctt
 721 gtacagcata tgtggatttt atgatttctg tggccagatt gattcgtcag gaagaaagat
 781 tgcccatcga tgaaaaccag cttgctttgg aaatgaataa agttatggaa ttggaaaaag
 841 aaattgccaa tgctacggct aaacctgaag atcgaaatga tccaatgctt ctgtataaca
 901 agatgacatt ggcccagatc caaaataact tttcactaga gatcaatggg aagccattca
 961 gctggttgaa tttcacaaat gaaatcatgt caactgtgaa tattagtatt acaaatgagg
1021 aagatgtggt tgtttatgct ccagaatatt taaccaaact taagcccatt cttaccaaat
1081 attctgccag agatcttcaa aatttaatgt cctggagatt cataatggat cttgtaagca
1141 gcctcagccg aacctacaag gagtccagaa atgctttccg caaggccctt tatggtacaa
1201 cctcagaaac agcaacttgg agacgttgtg caaactatgt caatgggaat atggaaaatg
1261 ctgtggggag gctttatgtg gaagcagcat ttgctggaga gagtaaacat gtggtcgagg
1321 atttgattgc acagatccga gaagttttta ttcagacttt agatgacctc acttggatgg
1381 atgccgagac aaaaaagaga gctgaagaaa aggccttagc aattaaagaa aggatcggct
1441 atcctgatga cattgtttca aatgataaca aactgaataa tgagtacctc gagttgaact
1501 acaaagaaga tgaatacttc gagaacataa ttcaaaattt gaaattcagc caaagtaaac
1561 aactgaagaa gctccgagaa aaggtggaca aagatgagtg gataagtgga gcagctgtag
1621 tcaatgcatt ttactcttca ggaagaaatc agatagtctt cccagccggc attctgcagc
1681 ccccttctt  tagtgcccag cagtccaact cattgaacta tgggggcatc ggcatggtca
1741 taggacacga aatcacccat ggcttcgatg acaatggcag aaactttaac aaagatggag
1801 acctcgttga ctggtggact caacagtctg caagtaactt taaggagcaa tcccagtgca
1861 tggtgtatca gtatggaaac ttttcctggg acctggcagg tggacagcac cttaatggaa
1921 ttaatacact gggagaaaac attgctgata atggaggtct tggtcaagca tacagagcct
1981 atcagaatta tattaaaaag aatggcgaag aaaaattact tcctggactt gacctaaatc
2041 acaaacaact atttttcttg aactttgcac aggtgtggtg tggaacctat aggccagagt
2101 atgcggttaa ctccattaaa acagatgtgc acagtccagg caatttcagg attattggga
2161 ctttgcagaa ctctgcagag ttttcagaag cctttcactg ccgcaagaat tcatacatga
2221 atccagaaaa gaagtgccgg gtttggtgat cttcaaaaga agcattgcag cccttggcta
2281 gacttgccaa caccacagaa atggggaatt ctctaatcga aagaaaatgg gccctagggg
2341 tcactgtact gacttgaggg tgattaacag agagggcacc atcacaatac agataacatt
2401 aggttgtcct agaaagggtg tggagggagg aagggggtct aaggtctatc aagtcaatca
2461 tttctcactg tgtacataat gcttaatttc taaagataat attactgttt atttctgttt
2521 ctcatatggt ctaccagttt gctgatgtcc ctagaaaaca atgcaaaacc tttgaggtag
2581 accaggattt ctaatcaaaa gggaaaagaa gatgttgaag aatacagtta ggcaccagaa
2641 gaacagtagg tgacactata gtttaaaaca cattgcctaa ctactagttt ttacttttat
2701 ttgcaacatt tacagtcctt caaaatcctt ccaaagaatt cttatacaca ttggggcctt
2761 ggagcttaca tagttttaaa ctcatttttg ccatacatca gttattcatt ctgtgatcat
2821 ttattttaag cactcttaaa gcaaaaaatg aatgtctaaa attgtttttt gttgtacctg
2881 ctttgactga tgctgagatt cttcaggctt cctgcaattt tctaagcaat ttcttgctct
2941 atctctcaaa acttggtatt tttcagagat ttatataaat gtaaaaataa taattttat
3001 atttaattat taactacatt tatgagtaac tattattata ggtaatcaat gaatattgaa
3061 gtttcagctt aaaataaaca gttgtgaacc aagatctata aagcgatata cagatgaaaa
3121 tttgagacta tttaaactta taaatcatat tgatgaaaag atttaagcac aaactttagg
3181 g
```

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

## 2. PDE de tipo 1

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSPDE1A3A 2008 pb mRNA PRI 12-abr-1996 |
| DEFINICION | mRNA de fosfodiesterasa de nucleótidos 3',5'-cíclicos humana (HSPDE1A3A), cd completo. |
| ACCESO | U40370 |
| NID | g1151108 |
| VERSION | U40370.1 GI: 1151108 |
| PALABRAS CLAVE | fosfodiesterasa estimulada por calmodulina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 2008) |
| AUTORES | Loughney, K., Martins., T.J., Harris, E.A., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., y Ferguson, K. |
| TITULO | Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterases |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 271 (2), 796-806 (1996) |
| MEDLINE | 96132810 |

PATRICIA ROSA MORENO
ING. ... Y ALEMAN
c. ... Cartagena, 113
Telef. ... - MADRID

REFERENCIA 2 (bases 1 a 2008)

AUTORES Loughney, K., Martins., T.J., Harris, E.A.S., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., y Ferguson, K.

TITULO Envío directo

REVISTA Enviado el 7 de noviembre de 1995. Kate Loughney, ICOS, 22021 20th Ave. S.E., Bothell, WA 98021, EE.UU.

```
CARACTERISTICAS          Localización/Cualificadores
source                   1...2008
                         /organism="Homo sapiens"
                         /db_xref="taxon:9606"
   gene                  85..1692
                         /gene="PDE1A"
   CDS                   85..1692
                         /gene="PDE1A"
                         /note="PDE1A3; type I phosphodiesterase"
                         /codon_start=1
                         /product="3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase"
                         /protein_id="AAC50436.1"
                         /db_xref="PID:g1151109"
                         /db_xref="GI:1151109"
                         /translation="MGSSATEIEELENTTFKYLTGEQTEKMWQRLKGILRCLVKQLER
                         GDVNVVDLKKNIEYAASVLEAVYIDETRRLLDTEDELSDIQTDSVPSEVRDWLASTFT
                         RKMGMTKKKPEEKPKFRSIVHAVQAGIFVERMYRKTYHMVGLAYPAAVIVTLKDVDKW
                         SFDVFALNEASGEHSLKFMIYELFTRYDLINRFKIPVSCLITFAEALEVGYSKYKNPY
                         HNLIHAADVTQTVHYIMLHTGIMHWLTELEILAMVFAAAIHDYEHTGTTNNFHIQTRS
                         DVAILYNDRSVLENHHVSAAYRLMQEEEMNILINLSKDDWRDLRNLVIEMVLSTDMSG
                         HFQQIKNIRNSLQQPEGIDRAKTMSLILHAADISHPAKSWKLHYRWTMALMEEFFLQG
                         DKEAELGLPFSPLCDRKSTMVAQSQIGFIDFIVEPTFSLLTDSTEKIVIPLIEEASKA
                         ETSSYVASSSTTIVGLHIADALRRSNTKGSMSDGSYSPDYSLAAVDLKSFKNNLVDII
                         QQNKERWKELAAQEARTSSQKCEFIHQ"
```

RECUENTO DE BASES 627 a, 400 c, 437 g, 544 t

PATRICIA ROCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. Cartagena, 113
Teléf. 519 58 90 - MADRID

ORIGEN

```
   1 gaattctgat gtgcttcagt gcacagaaca gtaacagatg agctgctttt ggggagagct
  61 tgagtactca gtcggagcat catcatgggg tctagtgcca cagagattga agaattggaa
 121 aacaccactt ttaagtatct tacaggagaa cagactgaaa aaatgtggca gcgcctgaaa
 181 ggaatactaa gatgcttggt gaagcagctg gaaagaggtg atgttaacgt cgtcgactta
 241 aagaagaata ttgaatatgc ggcatctgtg ctggaagcag tttatatcga tgaaacaaga
 301 agacttctgg atactgaaga tgagctcagt gacattcaga ctgactcagt cccatctgaa
 361 gtccgggact ggttggcttc tacctttaca cggaaaatgg ggatgacaaa aaagaaacct
 421 gaggaaaaac caaaatttcg gagcattgtg catgctgttc aagctggaat tttgtggaa
 481 agaatgtacc gaaaaacata tcatatggtt ggtttggcat atccagcagc tgtcatcgta
 541 acattaaagg atgttgataa atggtctttc gatgtatttg ccctaaatga agcaagtgga
 601 gagcatagtc tgaagtttat gatttatgaa ctgtttacca gatatgatct tatcaaccgt


 661 ttcaagattc ctgtttcttg cctaatcacc tttgcagaag ctttagaagt tggttacagc
 721 aagtacaaaa atccatatca caatttgatt catgcagctg atgtcactca aactgtgcat
 781 tacataatgc ttcatacagg tatcatgcac tggctcactg aactggaaat tttagcaatg
 841 gtctttgctg ctgccattca tgattatgag catacaggga caacaaacaa ctttcacatt
 901 cagacaaggt cagatgttgc cattttgtat aatgatcgct ctgtccttga gaatcaccac
 961 gtgagtgcag cttatcgact tatgcaagaa gaagaaatga atatcttgat aaatttatcc
1021 aaagatgact ggagggatct tcggaaccta gtgattgaaa tggttttatc tacagacatg
1081 tcaggtcact tccagcaaat taaaaatata agaaacagtt tgcagcagcc tgaagggatt
1141 gacagagcca aaaccatgtc cctgattctc cacgcagcag acatcagcca cccagccaaa
1201 tcctggaagc tgcattatcg gtggaccatg gccctaatgg aggagttttt cctgcaggga
1261 gataaagaag ctgaattagg gcttccattt tccccacttt gtgatcggaa gtcaaccatg
1321 gtggcccagt cacaaatagg tttcatcgat ttcatagtag agccaacatt ttctcttctg
1381 acagactcaa cagagaaaat tgttattcct cttatagagg aagcctcaaa agccgaaact
1441 tcttcctatg tggcaagcag ctcaaccacc attgtggggt tacacattgc tgatgcacta
1501 agacgatcaa atacaaaagg ctccatgagt gatgggtcct attccccaga ctactcccct
1561 gcagcagtgg acctgaagag tttcaagaac aacctggtgg acatcattca gcagaacaaa
1621 gagaggtgga aagagttagc tgcacaagaa gcaagaacca gttcacagaa gtgtgagttt
1681 attcatcagt aaacaccttt aagtaaaacc tcgtgcatgg tggcagctct aatttgacca
1741 aaagacttgg agattttgat tatgcttgct ggaaatctac cctgtcctgt gtgagacagg
1801 aaatctattt ttgcagattg ctcaataagc atcatgagcc acataaataa cagctgtaaa
1861 ctccttaatt caccgggctc aactgctacc gaacagattc atctagtggc tacatcagca
1921 ccttgtgctt tcagatatct gtttcaatgg cattttgtgg catttgtctt taccgagtgc
1981 caataaattt tctttgagca aaaaaaa
```

2. **PDE de tipo 2**

LOCUS HSU67733 4240 pb mRNA PRI 21-may-1997

DEFINICION mRNA de fosfodiesterasa de nucleótidos

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
[illegible], 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

1448

| | |
|---|---|
| | 3',5'-cíclicos humana estimulada por cGMP PDE2A3 (PDE2A), cd completo. |
| ACCESO | U67733 |
| NID | g2108051 |
| VERSION | U67733.1 GI: 2108051 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens |
| | Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 4240) |
| AUTORES | Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K. and Loughley, K. |
| TITULO | Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterase |
| REVISTA | Gene 191 (1), 89-95 (1997) |
| MEDLINE | 97354299 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 4240) |
| AUTORES | Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K. and Loughley, K. |
| TITULO | Envío directo |

PATRICIA HOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. ... 113
... MADRID
Telf. ...

1449

REVISTA Enviado el 21 de agosto de 1996. ICOS Corporation, 22021 20th Ave. S.E., Bothell, WA 98021, EE.UU.

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

```
source          1...4240
                 /organism="Homo sapiens"
                 /db_xref="taxon:9606"
  gene           162..2987
                 /gene="PDE2A"
  CDS            162..2987
                 /gene="PDE2A"
                 /function="cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide
                 phosphodiesterase"
                 /note="PDE2 family; splice variant 3"
                 /codon_start=1
                 /product="PDE2A3"
                 /protein_id="AAC51320.1"
                 /db_xref="PID:g2108052"
                 /db_xref="GI:2108052"
                 /translation="MGQACGHSILCRSQQYPAARPAEPRGQQVFLKPDEPPPPPQPCA
                 DSLQDALLSLGSVIDISGLQRAVKEALSAVLPRVETVYTYLLDGESQLVCEDPPHELP
                 QEGKVREAIISQKRLGCNGLGFSDLPGKPLARLVAPLAPDTQVLVMPLADKEAGAVAA
                 VILVHCGQLSDNEEWSLQAVEKHTLVALRRVQVLQQRGPREAPRAVQNPPEGTAEDQK
                 GGAAYTDRDRKILQLCGELYDLDASSLQLKVLQYLQQETRASRCCLLLVSEDNLQLSC
                 KVIGDKVLGEEVSFPLTGCLGQVVEDKKSIQLKDLTSEDVQQLQSMLGCELQAMLCVP
                 VISRATDQVVALACAFNKLEGDLFTDEDEHVIQHCFHYTSTVLTSTLAFQKEQKLKCE
                 CQALLQVAKNLFTHLDDVSVLLQEIITEARNLSNAEICSVFLLDQNELVAKVFDGGVV
                 DDESYEIRIPADQGIAGHVATTGQILNIPDAYAHPLFYRGVDDSTGFRTRNILCFPIK
                 NENQEVIGVAELVNKINGPWFSKFDEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHL
                 ANEMMMYHMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQ
                 DMNFINNYKIDCPTLARFCLMVKKGYRDPPYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLE
                 DIEIFALFISCMCHDLDHRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSVMERHHFAQAIAILNT
                 HGCNIFDHFSRKDYQRMLDLMRDIILATDLAHHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHHRL
                 LLCLLMTSCDLSDQTKGWKTTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIP
                 ELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNREHWTKVSHKFTIRGLPSNNSLD
                 FLDEEYEVPDLDGTRAPINGCCSLDAE"
```

RECUENTO DE BASES 902 a, 1260 c, 1202 g, 876 t

PATRICIA ROCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. [illegible] - MADRID

1450

ORIGEN

```
   1 cagcagagct ggattggggt gttgagtcca ggctgagtag ggggcagccc actgctcttg
  61 gtccctgtgc ctgctggggg tgccctgccc tgaactccag gcagcgggga cagggcgagg
 121 tgccacctta gtctggctgg ggaggcggac gatgaggagt gatggggcag gcatgcggcc
 181 actccatcct ctgcaggagc cagcagtacc cggcagcgcg accggctgag ccgcggggcc
 241 agcaggtctt cctcaagccg gacgagccgc cgccgccgcc gcagccatgc gccgacagcc
 301 tgcaggacgc cttgctgagt ctgggctctg tcatcgacat ttcaggcctg caacgtgctg
 361 tcaaggaggc cctgtcagct gtgctccccc gagtggaaac tgtctacacc tacctactgg
 421 atggtgagtc ccagctggtg tgtgaggacc ccccacatga gctgccccag gaggggaaag
 481 tccgggaggc tatcatctcc cagaagcggc tgggctgcaa tgggctgggc ttctcagacc
 541 tgccagggaa gcccttggcc aggctggtgg ctccactggc tcctgatacc caagtgctgg
 601 tcatgccgct agcggacaag gaggctgggg ccgtggcagc tgtcatcttg gtgcactgtg
 661 gccagctgag tgataatgag gaatggagcc tgcaggcggt ggagaagcat accctggtcg
 721 ccctgcggag ggtgcaggtc ctgcagcagc gcgggcccag ggaggctccc cgagccgtcc
 781 agaacccccc ggaggggacg gcggaagacc agaagggcgg ggcggcgtac accgaccgcg
 841 accgcaagat cctccaactg tgcggggaac tctacgacct ggatgcctct tccctgcagc
 901 tcaaagtgct ccaatacctg cagcaggaga cccgggcatc ccgctgctgc ctcctgctgg
 961 tgtcggagga caatctccag ctttcttgca aggtcatcgg agacaaagtg ctcggggaag
1021 aggtcagctt tcccttgaca ggatgcctgg gccaggtggt ggaagacaag aagtccatcc
1081 agctgaagga cctcacctcc gaggatgtac aacagctgca gagcatgttg ggctgtgagc
1141 tgcaggccat gctctgtgtc cctgtcatca gccgggccac tgaccaggtg gtggccttgg
1201 cctgcgcctt caacaagcta gaaggagact tgttcaccga cgaggacgag catgtgatcc
1261 agcactgctt ccactacacc agcaccgtgc tcaccagcac cctggccttc cagaaggaac
1321 agaaactcaa gtgtgagtgc caggctcttc tccaagtggc aaagaacctc ttcacccacc
1381 tggatgacgt ctctgtcctg ctccaggaga tcatcacgga ggccagaaac ctcagcaacg
1441 cagagatctg ctctgtgttc ctgctggatc agaatgagct ggtggccaag gtgttcgacg
1501 ggggcgtggt ggatgatgag agctatgaga tccgcatccc ggccgatcag ggcatcgcgg
1561 gacacgtggc gaccacgggc cagatcctga acatccctga cgcatatgcc catccgcttt
1621 tctaccgcgg cgtggacgac agcaccggct tccgcacgcg caacatcctc tgcttcccca
```

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
c. [illegible], 113
Telef. [illegible] - MADRID

1451

```
1681 tcaagaacga gaaccaggag gtcatcggtg tggccgagct ggtgaacaag atcaatgggc
1741 catggttcag caagttcgac gaggacctgg cgacggcctt ctccatctac tgcggcatca
1801 gcatcgccca ttctctccta tacaaaaaag tgaatgaggc tcagtatcgc agccacctgg
1861 ccaatgagat gatgatgtac cacatgaagg tctccgacga tgagtatacc aaacttctcc
1921 atgatgggat ccagcctgtg gctgccattg actccaattt tgcaagtttc acctataccc
1981 ctcgttccct gcccgaggat gacacgtcca tggccatcct gagcatgctg caggacatga
2041 atttcatcaa caactacaaa attgactgcc cgaccctggc ccggttctgt ttgatggtga
2101 agaagggcta ccgggatccc ccctaccaca actggatgca cgccttttct gtctcccact
2161 tctgctacct gctctacaag aacctggagc tcaccaacta cctcgaggac atcgagatct
2221 ttgccttgtt tatttcctgc atgtgtcatg acctggacca cagaggcaca aacaactctt
2281 tccaggtggc ctcgaaatct gtgctggctg cgctctacag ctctgagggc tccgtcatgg
2341 agaggcacca ctttgctcag gccatcgcca tcctcaacac ccacggctgc aacatctttg
2401 atcatttctc ccggaaggac tatcagcgca tgctggatct gatgcgggac atcatcttgg
2461 ccacagacct ggcccaccat ctccgcatct tcaaggacct ccagaagatg gctgaggtgg
2521 gctacgaccg aaacaacaag cagcaccaca gacttctcct ctgcctcctc atgacctcct
2581 gtgacctctc tgaccagacc aagggctgga agactacgag aaagatcgcg gagctgatct
2641 acaaagaatt cttctcccag ggagacctgg agaaggccat gggcaacagg ccgatggaga
2701 tgatggaccg ggagaaggcc tatatccctg agctgcaaat cagcttcatg gagcacattg
2761 caatgcccat ctacaagctg ttgcaggacc tgttccccaa agcggcagag ctgtacgagc
2821 gcgtggcctc caaccgtgag cactggacca aggtgtccca caagttcacc atccgcggcc
2881 tcccaagtaa caactcgctg gacttcctgg atgaggagta cgaggtgcct gatctggatg
2941 gcactagggc cccatcaat ggctgctgca gccttgatgc tgagtgatcc cctccaggac
3001 acttccctgc ccaggccacc tcccacagcc ctccactggt ctggccagat gcactgggaa
3061 cagagccacg ggtcctgggt cctagaccag gacttcctgt gtgaccctgg acaagtacta
3121 ccttcctggg cctcagcttt ctcgtctgta taatggaagc aagacttcca acctcacgga
3181 gactttgtaa tttgcttctc tgagagcaca ggggtgacca atgagcagtg ggccctactc
3241 tgcacctctg accacacctt ggcaagtctt tcccaagcca ttctttgtct gagcagcttg
3301 atggtttctc cttgccccat ttctgcccca ccagatcttt gctcctttcc ctttgaggac
3361 tcccaccctt tgggtctcca ggatcctcat ggaaggggaa ggtgagacat ctgagtgagc
3421 agagtgtggc atcttggaaa cagtccttag ttctgtggga ggactagaaa cagccgcggc
3481 gaaggccccc tgaggaccac tactatactg atggtgggat tgggacctgg gggatacagg
3541 ggccccagga agaagctggc cagaggggca gctcagtgct ctgcagagag gggccctggg
3601 gagaagcagg atgggattga tgggcaggag ggatccccgc actgggagac aggcccaggt
3661 atgaatgagc cagccatgct tcctcctgcc tgtgtgacgc tgggcgagtc tcttcccctg
3721 tctgggccaa acagggagcg ggtaagacaa tccatgctct aagatccatt ttagatcaat
3781 gtctaaaata gctctatggc tctgcggagt cccagcagag gctatggaat gtttctgcaa
3841 ccctaaggca cagagagcca accctgagtg tctcagaggc cccctgagtg ttccccttgg
3901 cctgagcccc ttacccattc ctgcagccag tgagagacct ggcctcagcc tggcagcgct
3961 ctcttcaagg ccatatccac ctgtgccctg gggcttggga gaccccatag gccgggactc
4021 ttgggtcagc ccgccactgg cttctctctt tttctccgtt tcattctgtg tgcgttgtgg
4081 ggtgggggag gggtccacc tgccttacct ttctgagttg cctttagaga gatgcgtttt
4141 tctaggactc tgtgcaactg tcgtatatgg tcccgtgggc tgaccgcttt gtacatgaga
4201 ataaatctat ttctttctac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 [illegible] - MADRID

1452

**4. NPY**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HUMNPY 551 pb mRNA PRI 7-ene-1995 |
| DEFINICION | mRNA de neuropéptido Y humano (NPY), cd completo. |
| ACCESO | K01911 |
| NID | g189273 |
| VERSION | K01911.1 GI:189273 |
| PALABRAS CLAVE | neuropéptido Y |
| FUENTE | feocromocitoma humano, cDNA a mRNA, clon pNPY3-75 |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 551) |
| AUTORES | Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M. y Dixon, J.E. |
| TITULO | Cloning, characterization and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine |
| REVISTA | Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (14), 4577-4581 (1984) |
| MEDLINE | 84272678 |
| COMENTARIO | El neuropéptido Y (NPY) es uno de los péptidos más abundantes en el sistema |

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 ... - MADRID

nervioso mamífero, y su extensa distribución sugiere un papel neurotransmisor o modulador. También se encuentra en algunas células de cromafina de la médula suprarrenal.

```
CARACTERISTICAS          Localización/Cualificadores
source                   1...551
                         /organism="Homo sapiens"
                         /db_xref="taxon:9606"
                         /tissue_type="pheochromocytoma"
                         /map="7pter-q22"
   mRNA                  <1..551
                         /gene="NPY"
                         /note="G00-119-456"
   gene                  1..551
                         /gene="NPY"
   sig_peptide           87..170
                         /gene="NPY"
                         /note="G00-119-456"
   CDS                   87..380
                         /gene="NPY"
                         /codon_start=1
                         /db_xref="GDB:G00-119-456"
                         /product="neuropeptide Y"
                         /protein_id="AAA59944.1"
                         /db_xref="PID:g189274"
                         /db_xref="GI:189274"
                         /translation="MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAED
                         MARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRLEDPAMW"
   mat_peptide           171..278
                         /gene="NPY"
                         /note="G00-119-456"
                         /product="neuropeptide Y"
```

RECUENTO DE BASES 131 a, 171 c, 129 g, 120 t

PATRICIA NEGRI MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Canteras, 13
Teléf. 51... - MADRID

ORIGEN 51 pb cadena arriba de un sitio RsaI

```
  1 accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc
 61 ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgactgggg ctgtccggac
121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgaggcg tacccctcca
181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
301 cactgatttc agacctcttg atgagagaaa gcacagaaaa tgttcccaga actcggcttg
361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
421 gcccatattt catcgtgtaa aacgagaatc cacccatcct accaatgcat gcagccactg
481 tgctgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
541 atcatgcatt c
```

## 5. Receptor de NPY Y1

LOCUS A26481 2624 pb mRNA PAT 17-oct-1995

DEFINICION cDNA del gen del receptor Y1 de NPY humano.

ACCESO A26481

NID g1247452

VERSION A26481.1 GI:1247452

PALABRAS CLAVE -

FUENTE humana

ORGANISMO Homo sapiens

Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata,
Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini,
Hominidae, Homo.

REFERENCIA 1 (bases 1 a 2624)

AUTORES -

TITULO HUMAN NEUROPEPTIDE Y-Y1 RECEPTOR

REVISTA Patente: WO 9309227-A 3 13 de mayo de 1993)

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

PATRICIA MORENO
INGLES Y ... MAN
C. ... 113
Telf. 51... - MADRID

1455

```
source          1..2624
                /organism="Homo sapiens"
                /db_xref="taxon:9606"
  CDS           152..1306
                /codon_start=1
                /product="neuropeptide Y Y1 receptor"
                /protein_id="CAA01819.1"
                /db_xref="PID:e205126"
                /db_xref="PID:g1247453"
                /db_xref="GI:1247453"
                /db_xref="SWISS-PROT:P25929"
                /translation="MNSTLFSQVENHSVHSNFSEKNAQLLAFENDDCHLPLAMIFTLA
                LAYGAVIILGVSGNLALIIIILKQKEMRNVTNILIVNLSFSDLLVAIMCLPFTFVYTL
                MDHWVFGEAMCKLNPFVQCVSITVSIFSLVLIAVERHQLIINPRGWRPNNRHAYVGIA
                VIWVLAVASSLPFLIYQVMTDEPFQNVTLDAYKDKYVCFDQFPSDSHRLSYTTLLLVL
                QYFGPLCFIFICYFKIYIRLKRRNNMMDKMRDNKYRSSETKRINIMLLSIVVAFAVCW
                LPLTIFNTVFDWNHQIIATCNHNLLFLLCHLTAMISTCVNPIFYGFLNKNFQRDLQFF
                FNFCDFRSRDDDYETIAMSTMHTDVSKTSLKQASPVAFKKINNNDDNEKI"
```

RECUENTO DE BASES 791 a, 479 c, 473 g, 878 t, 3 otras

ORIGEN

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

1456

```
   1 attgttcagt tcaagggaat gaagaattca gaataatttt ggtaaatgga ttccaatatc
  61 gggaataaga ataagctgaa cagttgacct gctttgaaga aacatactgt ccatttgtct
 121 aaaataatct ataacaacca aaccaatcaa aatgaattca acattatttt cccaggttga
 181 aaatcattca gtccactcta atttctcaga gaagaatgcc cagcttctgg cttttgaaaa
 241 tgatgattgt catctgccct tggccatgat atttacctta gctcttgctt atggagctgt
 301 gatcattctt ggtgtctctg gaaacctggc cttgatcata atcatcttga aacaaaagga
 361 gatgagaaat gttaccaaca tcctgattgt gaacctttcc ttctcagact tgcttgttgc
 421 catcatgtgt ctccccttta catttgtcta cacattaatg gaccactggg tctttggtga
 481 ggcgatgtgt aagttgaatc ctttgtgca atgtgtttca atcactgtgt ccattttctc
 541 tctggttctc attgctgtgg aacgacatca gctgataatc aaccctcgag ggtggagacc
 601 aaataataga catgcttatg taggtattgc tgtgatttgg gtccttgctg tggcttcttc
 661 tttgcctttc ctgatctacc aagtaatgac tgatgagccg ttccaaaatg taacacttga
 721 tgcgtacaaa gacaaatacg tgtgctttga tcaatttcca tcggactctc ataggttgtc
 781 ttataccact ctcctcttgg tgctgcagta ttttggtcca ctttgtttta tatttatttg
 841 ctacttcaag atatatatac gcctaaaaag gagaaacaac atgatggaca agatgagaga
 901 caataagtac aggtccagtg aaaccaaaag aatcaatatc atgctgctct ccattgtggt
 961 agcatttgca gtctgctggc tccctcttac catctttaac actgtgtttg attggaatca
1021 tcagatcatt gctacctgca accacaatct gttattcctg ctctgccacc tcacagcaat
1081 gatatccact tgtgtcaacc ccatatttta tgggttcctg aacaaaaact tccagagaga
1141 cttgcagttc ttcttcaact tttgtgattt ccggtctcgg gatgatgatt atgaaacaat
1201 agccatgtcc acgatgcaca cagatgtttc caaaacttct ttgaagcaag caagcccagt
1261 cgcatttaaa aaaatcaaca acaatgatga taatgaaaaa atctgaaact acttatagcc
1321 tatggtcccg gatgacatct gtttaaaaac aagcacaacc tgcaacatac tttgattacc
1381 tgttctccca aggaatgggg ttgaaatcat ttgaaaatga ctaagatttt cttgtcttgc

1441 tttttactg cttttgttgt agtgtcataa ttacatttgg aacaaaaggt gtgggctttg
1501 gggtcttctg gaaatagttt tgaccagaca tctttgaagt gctttttgtg aatttatgca
1561 tataatataa agacttttat actgtactta ttggaatgaa atttctttaa agtattacga
1621 tnnnctgact tcagaagtac ctgccatcca atacggtcat tagattgggt catcttgatt
1681 agattagatt agattagatt gtcaacagat tgggccatcc ttactttatg ataggcatca
1741 ttttagtgtg ttacaatagt aacagtatgc aaaagcagca ttcaggagcc gaaagatagt
1801 cttgaagtca ttcagaagtg gtttgaggtt tctgtttttt ggtggttttt gtttgttttt
1861 tttttttttc accttaaggg aggctttcat ttcctcccga ctgattgtca cttaaatcaa
1921 aatttaaaaa tgaataaaaa gacatacttc tcagctgcaa atattatgga gaattgggca
1981 cccacaggaa tgaagagaga aagcagctcc ccaacttcaa aaccattttg gtacctgaca
2041 acaagagcat tttagagtaa ttaatttaat aaagtaaatt agtattgctg caaatagcta
2101 aattatatct atttgaattg atggtcaaga gattttccat tttttttaca gactgttcag
2161 tgtttgtcaa gcttctggtc taatatgtac tcgaaagact ttccgcttac aatttgtaga
2221 aacacaaata tcgttttcca tacagcagtg cctatatagt gactgatttt aactttcaat
2281 gtccatcttt caaaggaagt aacaccaagg tacaatgtta aaggaatatt cactttacct
2341 agcagggaaa aatacacaaa aactgcagat acttcatata gcccatttta acttgtataa
2401 actgtgtgac ttgtggcgtc ttataaataa tgcactgtaa agattactga atagttgtgt
2461 catgttaatg tgcctaattt catgtatctt gtaatcatga ttgagcctca gaatcatttg
2521 gagaaactat attttaaaga acaagacata cttcaatgta ttatacagat aaagtattac
2581 atgtgtttga ttttaaaggg gcggacattt tattaaaatc aagg
```

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/ [illegible], 13
[illegible] - MADRID
Telf. [illegible]

1457

### 6. Receptor de NPY Y2

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSU36269 1200 pb mRNA PRI 14-nov-1995 |
| DEFINICION | mRNA del receptor Y2 de neuropéptido Y/péptido YY humano, cd completo. |
| ACCESO | U36269 |
| NID | g1063633 |
| VERSION | U36269.1 GI:1063633 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1200) |
| AUTORES | Gerald, C., Walker, M.W., Vayssem P.J., He, C., Brancheck, T.A. y Weinshank, R.L. |
| TITULO | Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 270 (45), 26758-26761 (1995) |
| MEDLINE | 96070760 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 1200) |
| AUTORES | Gerald, C.A. |

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
c [illegible], 113
Telf. [illegible] - MADRID

| | |
|---|---|
| TITULO | Envío directo |
| REVISTA | Enviada el 13 de septiembre de 1995. Christophe A. Gerald, Synaptic Pharmaceutical Corporation, Molecular Biology, 215 College Road, Paramus, NJ 07652, EE.UU. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1200 |
| | /organism="Homo sapiens"<br>/db_xref="taxon:9606"<br>/clone="hhY2"<br>/sex="male"<br>/tissue_type="brain hippocampus"<br>/dev_stage="adult" |
| 5'UTR | 1..20 |

PATENTIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telf. 519[illegible] - MADRID

```
     CDS             21..1166
                     /note="NPY/PYY Y2 receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor"
                     /protein_id="AAC50281.1"
                     /db_xref="PID:g1063634"
                     /db_xref="GI:1063634"
                     /translation="MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGPQTTPRGELVPDPEPELIDST
                     KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTL
                     CLPFTLTYTLMGEWKMGPVLCHLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKI
                     SKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEKSIYGTV
                     YSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAANDHYHQRRQKTTKMLVCVVVV
                     FAVSWLPLHAFQLAVDIDSQVLDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRK
                     AFLSAFRCEQRLDAIHSEVSVTFKAKKNLEVRKNSGPNDSFTEATNV"
     3'UTR           1164..1200
```

RECUENTO DE BASES 292 a, 295 c, 299 g, 314 t

ORIGEN

```
        1 caagtggacc tgtactgaaa atgggtccaa taggtgcaga ggctgatgag aaccagacag
       61 tggaagaaat gaaggtggaa caatacgggc cacaaacaac tcctagaggt gaactggtcc
      121 ctgaccctga gccagagctt atagatagta ccaagctgat tgaggtacaa gttgttctca
      181 tattggccta ctgctccatc atcttgcttg gggtaattgg caactccttg gtgatccatg
      241 tggtgatcaa attcaagagc atgcgcacag taaccaactt tttcattgcc aatctggctg
      301 tggcagatct tttggtgaac actctgtgtc taccgttcac tcttacctat accttaatgg
      361 gggagtggaa aatgggtcct gtcctgtgcc acctggtgcc ctatgcccag ggcctggcag
      421 tacaagtatc cacaatcacc ttgacagtaa ttgccctgga ccggcacagg tgcatcgtct
      481 accacctaga gagcaagatc tccaagcgaa tcagcttcct gattattggc ttggcctggg
      541 gcatcagtgc cctgctggca agtcccctgg ccatcttccg ggagtattcg ctgattgaga
      601 tcatcccgga ctttgagatt gtggcctgta ctgaaaagtg gcctggcgag gagaagagca
      661 tctatggcac tgtctatagt ctttcttcct tgttgatctt gtatgttttg cctctgggca
      721 ttatatcatt ttcctacact cgcatttgga gtaaattgaa gaaccatgtc agtcctggag
      781 ctgcaaatga ccactaccat cagcgaaggc aaaaaaccac caaaatgctg gtgtgtgtgg
      841 tggtggtgtt tgcggtcagc tggctgcctc tccatgcctt ccagcttgcc gttgacattg
      901 acagccaggt cctggacctg aaggagtaca aactcatctt cacagtgttc cacatcatcg
      961 ccatgtgctc cacttttgcc aatccccttc tctatggctg gatgaacagc aactacagaa
     1021 aggctttcct ctcggccttc cgctgtgagc agcggttgga tgccattcac tctgaggtgt
     1081 ccgtgacatt caaggctaaa aagaacctgg aggtcagaaa gaacagtggc cccaatgact
     1141 ctttcacaga ggctaccaat gtctaaggaa gctgtggtgt gaaaatgtat ggatgaattc
```

## 7. Receptor de NPY Y5

KOHN MORENO
ALEMAN
113
ADRID
Telé

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSU66275 1370 pb mRNA PRI 18-oct-1996 |
| DEFINICION | mRNA del receptor Y5 de neuropéptido humano (NPYR5), cd completo. |
| ACCESO | U66275 |
| NID | g1620655 |
| VERSION | U66275.1 GI:1620655 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1370) |
| AUTORES | Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., DeCarr, L.B:, Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang., P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velázquez, N. y McCaleb, M.L. |
| TITULO | Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behaviour |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 271 (42), 26315-26319 (1996) |
| MEDLINE | 96421636 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 1370) |
| AUTORES | Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., |

PATRICIA NOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

1461

DeCarr, L.B:, Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang., P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velázquez, N. y McCaleb, M.L.

TITULO Envío directo

REVISTA Enviada el 6 de agosto de 1996. Metabolic Disorders. Bayer Corporation, 400 Morgan Lane, West Haven, CT 06516, EE.UU.

```
CARACTERISTICAS          Localización/Cualificadores
source                   1..1370
                  /organism="Homo sapiens"
                  /db_xref="taxon:9606"
      gene        18..1355
                  /gene="NPYR5"
      CDS         18..1355
                  /gene="NPYR5"
                  /function="G protein-coupled receptor"
                  /codon_start=1
                  /product="neuropeptide Y5 receptor"
                  /protein_id="AAC50741.1"
                  /db_xref="PID:g1620656"
                  /db_xref="GI:1620656"
                  /translation="MDLELDEYYNKTLATENNTAATRNSDFPVWDDYKSSVDDLQYFL
                  IGLYTFVSLLGFMGNLLILMALMKKRNQKTTVNFLIGNLAFSDILVVLFCSPFTLTSV
                  LLDQWMFGKVMCHIMPFLQCVSVLVSTLILISIAIVRYHMIKHPISNNLTANHGYFLI
                  ATVWTLGFAICSPLPVFHSLVELQETFGSALLSSRYLCVESWPSDSYRIAFTISLLLV
                  QYILPLVCLTVSHTSVCRSISCGLSNKENRLEENEMINLTLHPSKKSGPQVKLSGSHK
                  WSYSFIKKHRRRYSKKTACVLPAPERPSQENHSRILPENFGSVRSQLSSSSKFIPGVP
                  TCFEIKPEENSDVHELRVKRSVTRIKKRSRSVFYRLTILILVFAVSWMPLHLFHVVTD
                  FNDNLISNRHFKLVYCICHLLGMMSCCLNPILYGFLNNGIKADLVSLIHCLHM"
```

RECUENTO DE BASES 392 a, 263 c, 257 g, 458 t

ORIGEN

PETRIA KOCH MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
c/ Cartagena, 113
Telf. 519 3990 - MADRID

1462

```
   1 ccaagcagga ctataatatg gatttagagc tcgacgagta ttataacaag acacttgcca
  61 cagagaataa tactgctgcc actcggaatt ctgatttccc agtctgggat gactataaaa
 121 gcagtgtaga tgacttacag tattttctga ttgggctcta tacatttgta agtcttcttg
 181 gctttatggg gaatctactt attttaatgg ctctcatgaa aaagcgtaat cagaagacta

 241 cggtaaactt cctcataggc aatctggcct tttctgatat cttggttgtg ctgttttgct
 301 cacctttcac actgacgtct gtcttgctgg atcagtggat gtttggcaaa gtcatgtgcc
 361 atattatgcc ttttcttcaa tgtgtgtcag ttttggtttc aactttaatt ttaatatcaa
 421 ttgccattgt caggtatcat atgataaaac atcccatatc taataattta acagcaaacc
 481 atggctactt tctgatagct actgtctgga cactaggttt tgccatctgt tctccccttc
 541 cagtgtttca cagtcttgtg gaacttcaag aaacatttgg ttcagcattg ctgagcagca
 601 ggtatttatg tgttgagtca tggccatctg attcatacag aattgccttt actatctctt
 661 tattgctagt tcagtatatt ctgcccttag tttgtcttac tgtaagtcat acaagtgtct
 721 gcagaagtat aagctgtgga ttgtccaaca aagaaaacag acttgaagaa aatgagatga
 781 tcaacttaac tcttcatcca tccaaaaaga gtgggcctca ggtgaaactc tctggcagcc
 841 ataaatggag ttattcattc atcaaaaaac acagaagaag atatagcaag aagacagcat
 901 gtgtgttacc tgctccagaa agaccttctc aagagaacca ctccagaata cttccagaaa
 961 actttggctc tgtaagaagt cagctctctt catccagtaa gttcatacca ggggtcccca
1021 cttgctttga gataaaacct gaagaaaatt cagatgttca tgaattgaga gtaaaacgtt
1081 ctgttacaag aataaaaaag agatctcgaa gtgttttcta cagactgacc atactgatat
1141 tagtatttgc tgttagttgg atgccactac accttttcca tgtggtaact gattttaatg
1201 acaatcttat ttcaaatagg catttcaagt tggtgtattg catttgtcat ttgttgggca
1261 tgatgtcctg ttgtcttaat ccaattctat atgggtttct taataatggg attaaagctg
1321 atttagtgtc ccttatacac tgtcttcata tgtaataatt ctcactgttt
```

8. VIP

| | |
|---|---|
| LOCUS | VIP 1511 pb mRNA PRI 19-mar-1999 |
| DEFINICION | mRNA del péptido intestinal vasoactivo (VIP) de Homo sapiens. |
| ACCESO | NM_003381 |
| NID | g4507896 |
| VERSION | NM_003381.1 GI:4507896 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |

PATRICIA INCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. [illegible], 113
Telf. [illegible] - MADRID

| | |
|---|---|
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1511) |
| AUTORES | DeLamarter, J.F., Buell, G.N., Kawashima, E., Polak, J.M. y Bloom, S.R. |
| TITULO | Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in bacterial cells |
| REVISTA | Peptides 6 Supl. 1, 95-102 (1985) |
| MEDLINE | 86016352 |
| COMENTARIO | REFSEQ: Esta secuencia de referencia se derivó de M36634.<br>RefSeq PROVISIONAL: Es un registro de secuencia de referencia provisional que no ha sido sujeto todavía a revisión humana. El registro de secuencia de referencia refinado final puede ser algo diferente de este. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1511 |

ATILIA ... MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telf. ... MADRID

```
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579

                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331
```

RECUENTO DE BASES 541 a, 255 c, 276 g, 439 t

ORIGEN

[illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. [illegible] - MADRID

1465

```
   1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
  61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
 121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
 181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
 241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
 301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
 361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
 421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
 481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
 541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
 601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
 661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
 721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
 781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
 841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
 901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
 961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
1081 ataaaaagac attcttccaa aaagatttcc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1501 aaaaaaaaaa a
```

9. **Receptor de VPAC1**

LOCUS VIP 1511 pb mRNA PRI 19-mar-1999

DEFINICION mRNA del péptido intestinal vasoactivo (VIP) de Homo sapiens.

ACCESO NM_003381

NID g4507896

VERSION NM_003381.1 GI:4507896

PALABRAS CLAVE -

[illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
c/ [illegible] 113
Telef. [illegible] - MADRID

| | |
|---|---|
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1511) |
| AUTORES | DeLamarter, J.F., Buell, G.N., Kawashima, E., Polak, J.M. y Bloom, S.R. |
| TITULO | Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in bacterial cells |
| REVISTA | Peptides 6 Supl. 1, 95-102 (1985) |
| MEDLINE | 86016352 |
| COMENTARIO | REFSEQ: Esta secuencia de referencia se derivó de M36634.<br>RefSeq PROVISIONAL: Es un registro de secuencia de referencia provisional que no ha sido sujeto todavía a revisión humana. El registro de secuencia de referencia refinado final puede ser algo diferente de este. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1511 |

PATRICIA MACH MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
c. Cartagena, 113
Teléf. 5195900 - MADRID

1467

```
                      /organism="Homo sapiens"
                      /db_xref="taxon:9606"
                      /map="6q24-q27"
                      /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene             1..1511
                      /gene="VIP"
                      /db_xref="MIM:192320"
                      /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide      67..129
                      /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS              67..579

                    /gene="VIP"
                    /codon_start=1
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
                    /protein_id="NP_003372.1"
                    /db_xref="PID:g4507897"
                    /db_xref="GI:4507897"
                    /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                    GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                    LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                    SPDFPEELEK"
     mat_peptide    307..387
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide    439..522
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal   1326..1331
```

RECUENTO DE BASES 541 a, 255 c, 276 g, 439 t

ORIGEN

5

PATENTES KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 5195890 - MADRID

```
   1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
  61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
 121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
 181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
 241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
 301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
 361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
 421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
 481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
 541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
 601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
 661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
 721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
 781 aatagtattt gagagttcta aatttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
 841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
 901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
 961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
1081 ataaaaagac attcttccaa aaagattttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1501 aaaaaaaaaa a
```

## 10. Receptor de VPAC2

| | |
|---|---|
| LOCUS | HUMHVRP 1640 pb mRNA PRI 16-feb-1995 |
| DEFINICION | mRNA del receptor de VIP con preferencia por helodermina humano (receptor VIP2/PACAP) |
| ACCESO | L36566 |
| NID | g550477 |
| VERSION | L36566.1 GI:550477 |

[illegible] MORENO
ING [illegible] Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

| | |
|---|---|
| PALABRAS CLAVE | Receptor de PACAP, receptor de VIP, receptor de VIP con preferencia por helodermina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1640) |
| AUTORES | Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., J., Goosens, J.F., De Neef, P., Waelbroeck, M., y Robberecht, P. |
| TITULO | Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts |
| REVISTA | Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (3), 1617-1624 (1994) |
| MEDLINE | 95110300 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1640 |

PATENTES ... MORENO
INGENIEROS Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 55 90 - MADRID

1470

```
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_line="SUP T1 lymphoblast"
                     /clone_lib="lamda ZAP II"
     sig_peptide     163..231
                     /note="putative; putative"
     CDS             163..1479
                     /note="human VIP2 receptor was previously called
                     'helodermin-preferring VIP receptor'; transmembrane
                     domains are located at positions: 637-696; 772-844;
                     880-948; 1003-1071; 1147-1209; 1243-1302.; Potential
                     glycosylation sites are located at :334-336; 424-426;
                     436-438."
                     /codon_start=1
                     /function="VIP and PACAP receptor"
                     /protein_id="AAC37569.1"
                     /db_xref="PID:g550478"
                     /db_xref="GI:550478"
                     /translation="MRTLLPPALLTCWLLAPVNSIHPECRFHLEIQEEETKCTELLRS
                     QTEKHKACSGVWDNITCWRPANVGETVTVPCPKVFSNFYSKAGNISKNCTSDGWSETF
                     PDFVDACGYSDPEDESKITFYILVKAIYTLGYSVSLMSLATGSIILCLFRKLHCTRNY
                     IHLNLFLSFILRAISVLVKDDVLYSSSGTLHCPDQPSSWVGCKLSLVFLQYCIMANFF

                     WLLVEGLYLHTLLVAMLPPRRCFLAYLLIGWGLPTVCIGAWTAARLYLEDTGCWDTND
                     HSVPWWVIRIPILISIIVNFVLFISIIRILLQKLTSPDVGGNDQSQYKRLAKSTLLLI
                     PLFGVHYMVFAVFPISISSKYQILFELCLGSFQGLVVAVLYCFLNSEVQCELKRKWRS
                     RCPTPSASRDYRVCGSSFSHNGSEGALQFHRASRAQSFLQTETSVI"
     mat_peptide     232..1476
                     /function="VIP and PACAP receptor"
```

RECUENTO DE BASES 315 a, 512 c, 461 g, 352 t

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 56 90 - MADRID

ORIGEN

```
   1 cgggacgagg gggcggcccc cgcgctcggg gcgctcggct acagctgcgg ggcccgaggt
  61 ctccgcgcac tcgctcccgg cccatgctgg aggcggcgga acccggggga cctaggacgg
 121 aggcggcggg cgctgggcgg cccccggcac gctgagctcg ggatgcggac gctgctgcct
 181 cccgcgctgc tgacctgctg gctgctcgcc cccgtgaaca gcattcaccc agaatgccga
 241 tttcatctgg aaatacagga ggaagaaaca aaatgtacag agcttctgag gtctcaaaca
 301 gaaaaacaca aagcctgcag tggcgtctgg gacaacatca cgtgctggcg gcctgccaat
 361 gtgggagaga ccgtcacggt gccctgccca aaagtcttca gcaattttta cagcaaagca
 421 ggaaacataa gcaaaaactg tacgagtgac ggatggtcag agacgttccc agatttcgtc
 481 gatgcctgtg gctacagcga cccggaggat gagagcaaga tcacgtttta tattctggtg
 541 aaggccattt ataccctggg ctacagtgtc tctctgatgt ctcttgcaac aggaagcata
 601 attctgtgcc tcttcaggaa gctgcactgc accaggaatt acatccacct gaacctgttc
 661 ctgtccttca tcctgagagc catctcagtg ctggtcaagg acgacgttct ctactccagc
 721 tctggcacgt tgcactgccc tgaccagcca tcctcctggg tgggctgcaa gctgagcctg
 781 gtcttcctgc agtactgcat catggccaac ttcttctggc tgctggtgga ggggctctac
 841 ctccacaccc tcctggtggc catgctcccc cctagaaggt gcttcctggc ctacctcctg
 901 atcggatggg gcctccccac cgtctgcatc ggtgcatgga ctgcggccag gctctactta
 961 gaagacaccg gttgctggga tacaaacgac cacagtgtgc cctggtgggt catacgaata
1021 ccgattttaa tttccatcat cgtcaatttt gtccttttca ttagtattat acgaattttg
1081 ctgcagaagt taacatcccc agatgtcggc ggcaacgacc agtctcagta caagaggctg
1141 gccaagtcca cgctcctgct tatcccgctg ttcggcgtcc actacatggt gtttgccgtg
1201 tttcccatca gcatctcctc caaataccag atactgtttg agctgtgcct cgggtcgttc
1261 cagggcctgg tggtggccgt cctctactgt ttcctgaaca gtgaggtgca gtgcgagctg
1321 aagcgaaaat ggcgaagccg gtgcccgacc ccgtccgcga gccgggatta cagggtctgc
1381 ggttcctcct tctcccacaa cggctcggag ggcgccctgc agttccaccg cgcgtcccga
1441 gcccagtcct tcctgcaaac ggagacctcg gtcatctagc cccacccctg cctgtcggac
1501 gcggcgggag gcccacggtt cggggcttct gcggggctga gacgccggct tcctccttcc
1561 agatgccccga gcaccgtgtc gggcaggtca gcgcggtcct gactccgtca agctggttgt
1621 ccactaaacc ccatacctgg
```

PATRICIA KOCH MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
c. Cartagena, 113
Telf. 519 59 90 - MADRID

## ABREVIATURAS

FSD = disfunción sexual femenina

FSAD = trastorno de la excitación sexual femenina

cAMP = 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico

cGMP = 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico

$P_{cAMP}$ = potenciador de cAMP

$P_{cGMP}$ = potenciador de cGMP

$A_{cAMP}$ = activador de cAMP

$A_{cGMP}$ = activador de cGMP

$AM_{cAMP}$ = modulador adverso de cAMP

$AM_{cGMP}$ = modulador adverso de cGMP

$I_{cAMP}$ = inhibidor de cAMP

$I_{cGMP}$ = inhibidor de cGMP

$I:I_{cAMP}$ = inhibidor de un inhibidor de cAMP

$I:I_{cGMP}$ = inhibidor de un inhibidor de cGMP

$I:AM_{cAMP}$ = inhibidor de un modulador adverso de cAMP

$I:AM_{cGMP}$ = inhibidor de un modulador adverso de cGMP

$U:A_{cAMP}$ = sobrerregulador de un activador de cAMP

$U:A_{cGMP}$ = sobrerregulador de un activador de cGMP

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 5195990 - MADRID

AC = adenilato ciclasa

A:AC = activador de AC

NEP = endopeptidasa neutra

I:NEP = inhibidor de NEP

VIP = péptido intestinal vasoactivo

VIPr = receptor de VIP (puede expresarse como VIPR)

$VIP_n$ = receptor de un subtipo de VIP (tal como VIPR1, VIPR2)

A:VIPr = activador de VIPr

A:$VIP_n$ = activador de $VIP_n$

I:VIPr = inhibidor de VIPr

I:$VIP_n$ = inhibidor de $VIP_n$

I:I:VIPr = inhibidor de un inhibidor de VIPr

I:I:$VIP_n$ = inhibidor de un inhibidor de $VIP_n$

PDE = fosfodiesterasa

PDEn = familia de las PDE (por ejemplo PDE1, PDE2, etc.)

$PDE_{cAMP}$ = PDE hidrolizante de cAMP

$PDE_{cGMP}$ = PDE hidrolizante de cGMP

I:PDE = inhibidor de una PDE

I:$PDE_{cAMP}$ = inhibidor de una PDE hidrolizante de cAMP

I:$PDE_{cAMP}$ = inhibidor de una familia de PDE capaz de

[illegible] MORENO
[illegible] Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

hidrolizar cAMP

NPY = neuropéptido Y

NPYr = receptor de NPY (puede expresarse como NPYR)

NPY $Y_n$ = subtipo de receptor $Y_n$ de NPY (por ejemplo NPY $Y_1$) (por ejemplo NPYR1)

I:NPY = inhibidor de NPY

I:NPY $Y_n$ = inhibidor de NPY $Y_n$ (donde n denota el subtipo de receptor de NPY)

kDa = kilodalton

pb = par de bases

kb = kilopar de bases

PATRICIA KLEIN MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 56 93 - MADRID

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el agente es un mediador de la vasorrelajación genital (por ejemplo vaginal o clitorídea).

3. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la composición es para administración oral.

4. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el citado cAMP es cAMP endógeno.

5. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición se administra antes o durante la estimulación sexual.

PATRICIA ROCH MORENO
INGS. S Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telf. 5195990 - MADRID

6. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD.

7. El uso según la reivindicación 6, en el que el agente es un mediador de la vasorrelajación genital (por ejemplo vaginal o clitorídea).

8. El uso según las reivindicaciones 6 ó 7, en la que el medicamento es para administración oral.

9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el citado cAMP es cAMP endógeno.

10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la composición se administra antes o durante la estimulación sexual.

11. Un procedimiento de tratamiento de una hembra (tal como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la

PAT. ... MORENO
ING ... ROMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 5195930 - MADRID

potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. Un procedimiento según la reivindicación 11 en el que el agente es un mediador de la vasorrelajación genital (por ejemplo vaginal o clitorídea).

13. Un procedimiento según las reivindicaciones 11 ó 12, en la que el agente se administra oralmente.

14. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que el citado cAMP es cAMP endógeno.

15. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en la que la composición se administra antes o durante la estimulación sexual.

16. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar FSD, en particular FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el

c. Cartagena, 113
MADRID

tratamiento de FSD, en particular FSAD.

17. Un procedimiento que comprende las etapas de:

(a) realizar el ensayo según la reivindicación 16.

(b) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente el cAMP, y

(c) preparar una cantidad de unoo más de ese o esos agentes identificados.

18. Un procedimiento de tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD, por potenciación de cAMP in vivo con un agente,

siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente el cAMP en un procedimiento de ensayo in vitro,

siendo el procedimiento de ensayo in vitro el procedimiento de ensayo definido en la reivindicación 16.

19. El uso de un agente en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de FSD,

MORENO
Y ALEMAN
113
MADRID

preferiblemente FSAD, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente el cAMP cuando se ensaya in vitro mediante un procedimiento de ensayo según la reivindicación 16.

20. Un agente identificado por el procedimiento de ensayo según la reivindicación 16.

21. Un agente según la reivindicación 20 para uso en medicina.

22. Un agente según la reivindicación 21 para uso en el tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD.

23. Un medicamento de administración oral para tratar FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el medicamento el agente según la reivindicación 20.

24. Un procedimiento de diagnóstico, comprendiendo el procedimiento aislar una muestra de una hembra, determinar si la muestra contiene una entidad presente en una cantidad tal que produzca FSD, preferiblemente FSAD, o si está en una cantidad como para producir FSD, preferiblemente FSAD, teniendo la entidad un efecto directo o indirecto sobre el nivel o la actividad de cAMP en los genitales sexuales de

[illegible] MORENO
[illegible] Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Telél. 515 58 90 - MADRID

1480

la hembra.

25. Una composición o estuche de diagnóstico que comprende medios para detectar una entidad en una muestra aislada de una hembra, pudiendo utilizarse los medios para determinar si la muestra contiene la entidad presente en una cantidad tal que produzca FSD, preferiblemente FSAD, o si está en una cantidad como para producir FSD, preferiblemente FSAD, teniendo la entidad un efecto directo o indirecto sobre el nivel o la actividad del cAMP en los genitales sexuales de la hembra.

26. Un modelo animal utilizado para identificar agentes capaces de tratar FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el citado modelo un animal hembra anestesiado, incluyendo los medios para medir los cambios del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo) del citado animal a continuación de la estimulación del nervio pélvico de éste.

27. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente el cAMP para tratar FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: administrar un agente al modelo animal de la reivindicación 26, y medir cualquier

MORENO
Y ... MAN
113
Telef. ... - MADRID

potenciación de cAMP y/o aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo) del citado animal.

28. Un agente identificado por el procedimiento de ensayo de la reivindicación 27.

29. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente al menos uno de un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

30. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD, y siendo el citado agente al menos uno de un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

31. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente

PATENTES ... MORENO
ING... Y ... MAN
c/ Cartagena, 113
Telef. 519 ... 90 - MADRID

o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente al menos uno de un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

32. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente al menos uno de un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

33. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (vaginal o clitorídeo), y siendo el citado agente al menos uno de un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

34. Un procedimiento de tratamiento de una hembra por FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente, y siendo el citado agente al menos uno de un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

35. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 34, en la que el citado agente

PATRICIA [illegible] MORENO
ING. [illegible] Y [illegible]MAN
c. Cartagena, 113
Telef. 519 [illegible] 90 - MADRID

potencia el cAMP.

36. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el citado cAMP es cAMP endógeno (como se ha definido en la presente)

P[illegible] MORENO
ING. [illegible] AN
C. [illegible], 113
Telef. 519 59 90 - MADRID

1489

## RESUMEN

## PRODUCTO FARMACEUTICO

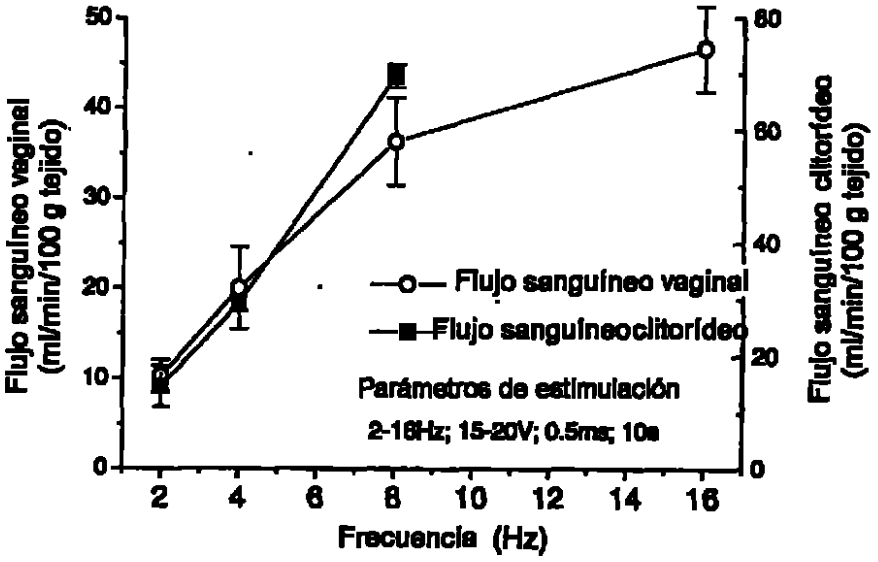
Se describe un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD. El procedimiento comprende suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad tal que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la hembra. El agente puede mezclarse con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

PATENTES ... MORENO
ING... Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 5195990 - MADRID

1485.

Figura 1

Flujo sanguíneo genital. Relación de respuesta a la frecuencia entre la estimulación del nervio pélvico y el flujo sanguíneo

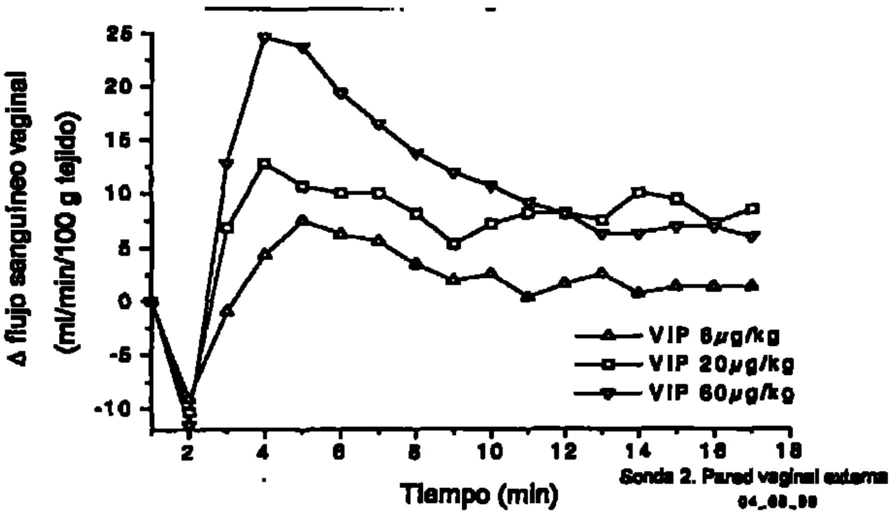


PATRICIA ... MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
c. ... 113
Telf. 519 ... 90 - MADRID

Figura 2

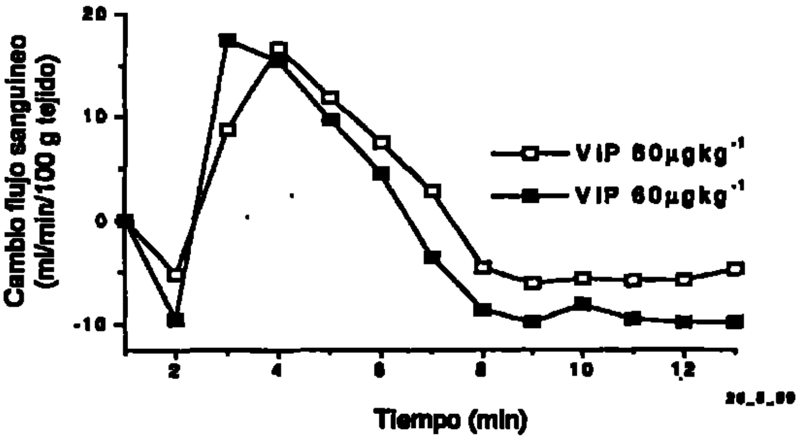
Efecto de VIP en el flujo sanguíneo vaginal

a



Efectos de infusiones repetidas de VIP sobre el flujo sanguíneo vaginal

b



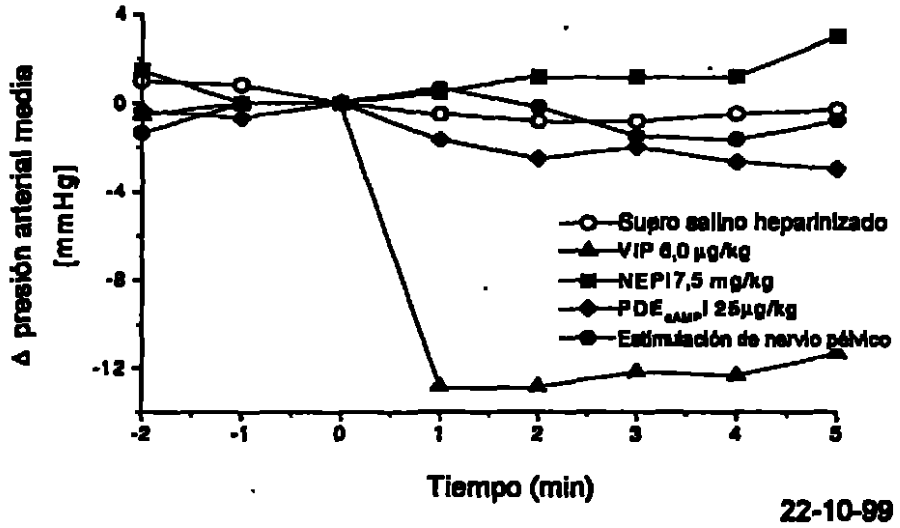
2b

PATENTES Y MARCAS MORENO
ALEMAN
C. Cartagena, 113
Teléf. 5159190 - MADRID

1487

Figura 3

Efecto de VIP, de un inhibidor de NEP, de un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ o de la estimulación del nervio pélvico sobre la presión arterial media en conejo anestesiado



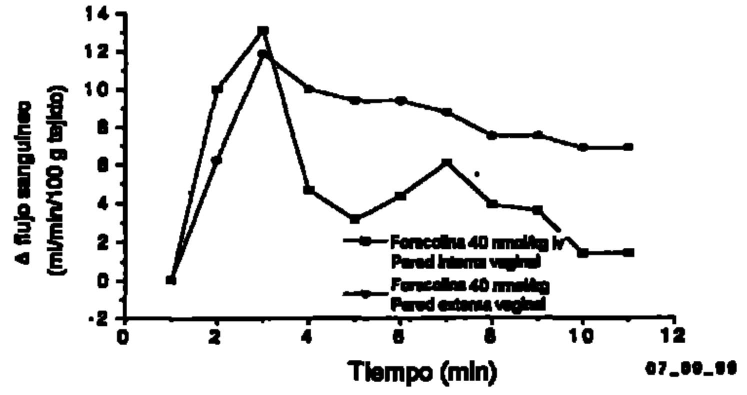
22-10-99

1488/7/02

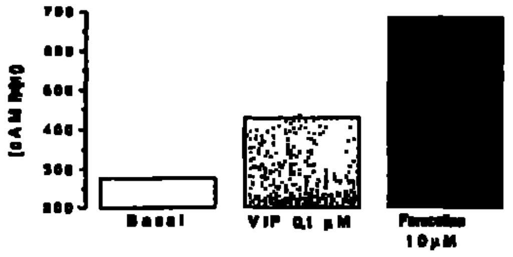
PATENTES ... MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. [illegible], 113
Telef. 5.. ... - MADRID

## Figura 4

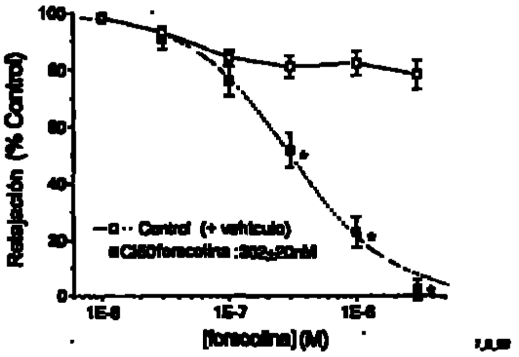
4a) La forscolina (un mimético de cAMP) aumenta el flujo sanguíneo vaginal en conejo anestesiado



4b) VIP estimula la producción de cAMP en vagina de conejo aislada



4c) Efecto relajante de la forscolina (un mimético de cAMP) sobre vagina de conejo aislada

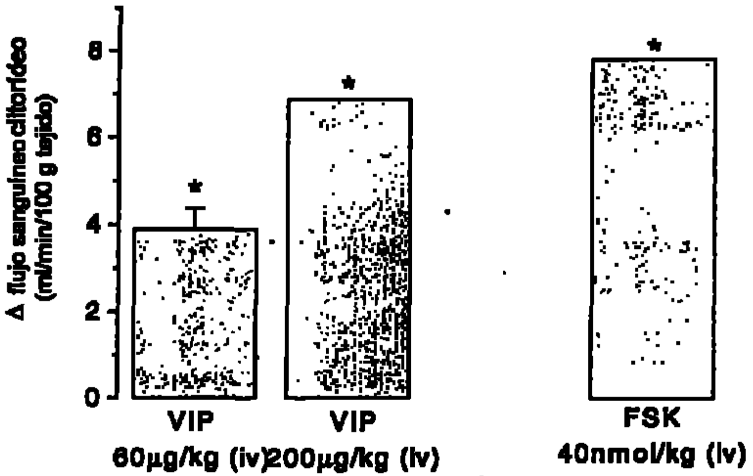


PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. [illegible], 113
Teléf. [illegible] - MADRID

1489

## Figura 5

## VIP y forscolina (un mimético de cAMP) aumentan el flujo sanguíneo clitorídeo en conejo anestesiado

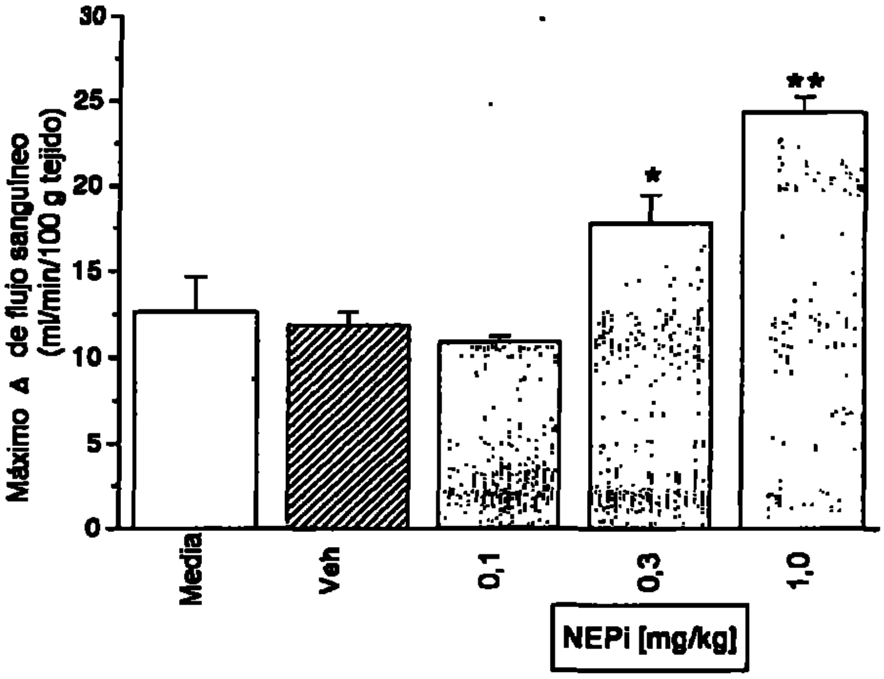


[illegible] Y ALEMAN
c/ [illegible], 113
Telef. [illegible] - MADRID

1490

Figura 6

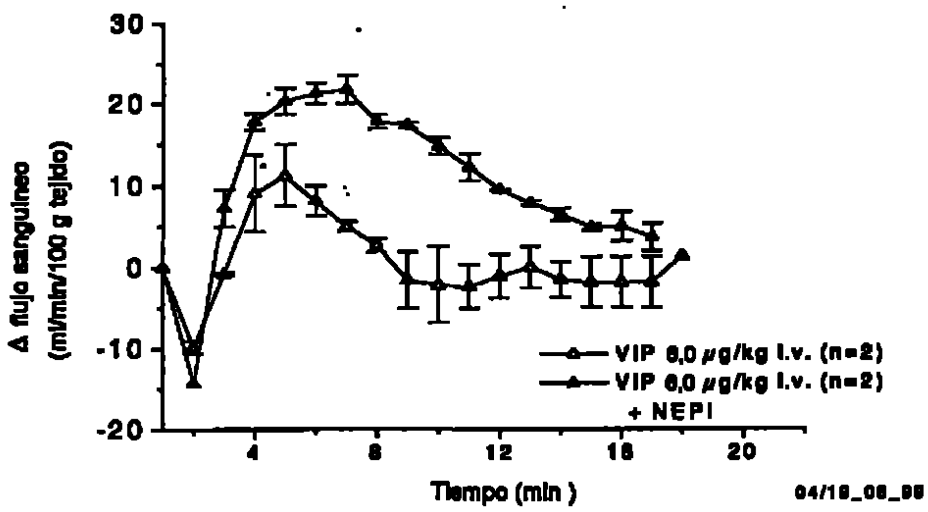
Efecto de un inhibidor de NEP sobre los cambios por estimulación del nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal de conejo anestesiado



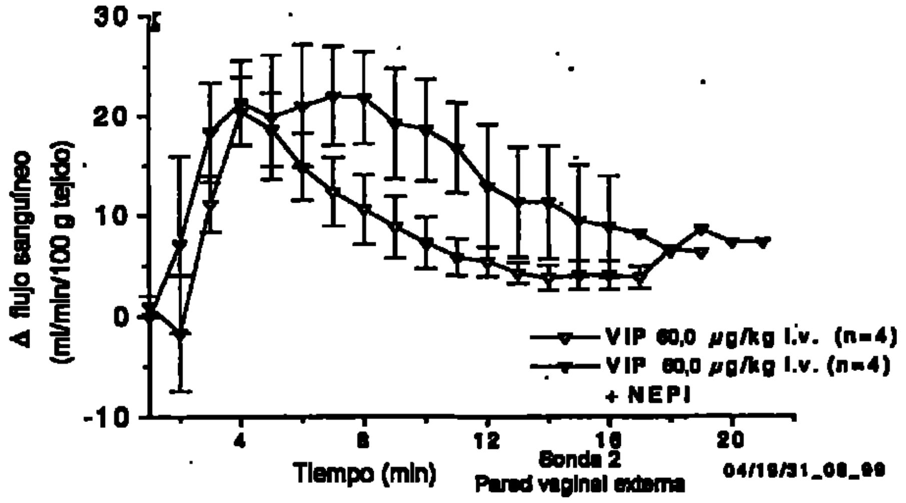
ING. ... 113
Telf. ... MADRID

Figura 7

Efecto de VIP (6 µg/kg) sobre el flujo sanguíneo vaginal en presencia y ausencia de un inhibidor de NEP



Efecto de VIP (60 µg/kg) sobre el flujo sanguíneo vaginal en presencia y ausencia de un inhibidor de NEP

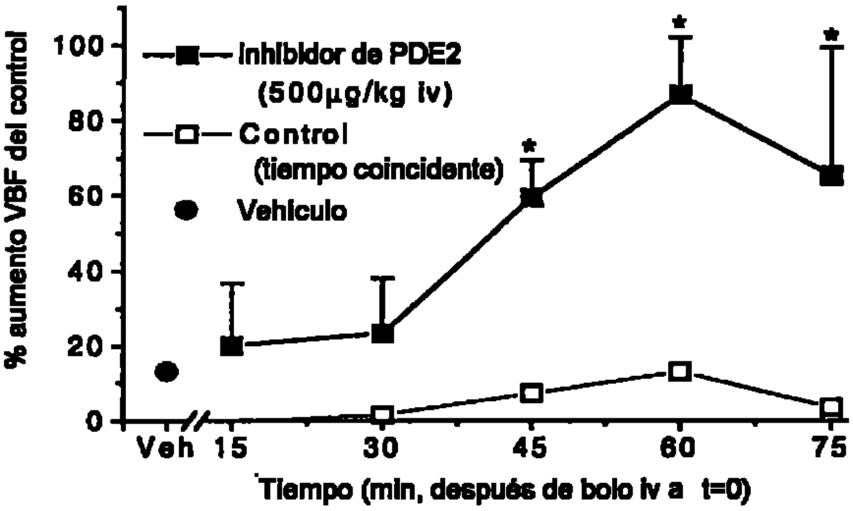


[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

1492

Figura 8

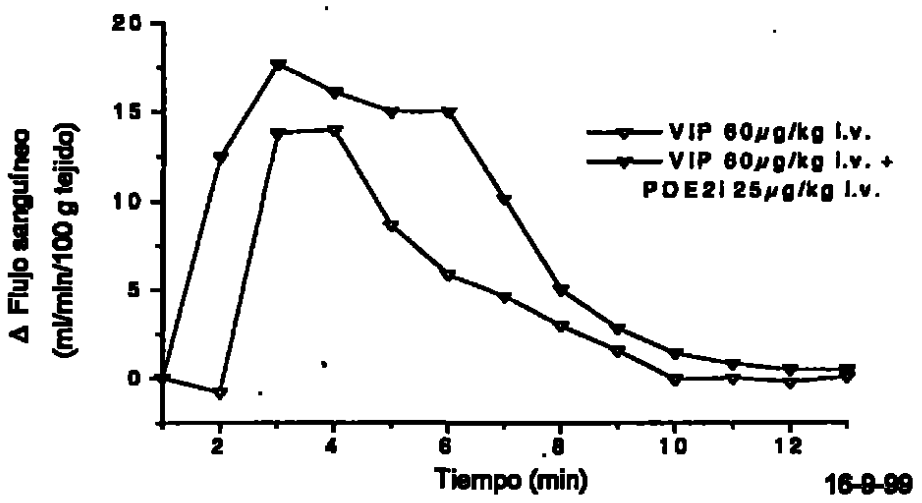
## Efecto de un inhibidor de PDE$_{cAMP}$ de tipo 2 sobre los aumentos por estimulación del nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal



[illegible] 113 [illegible] MADRID

## Figura 9

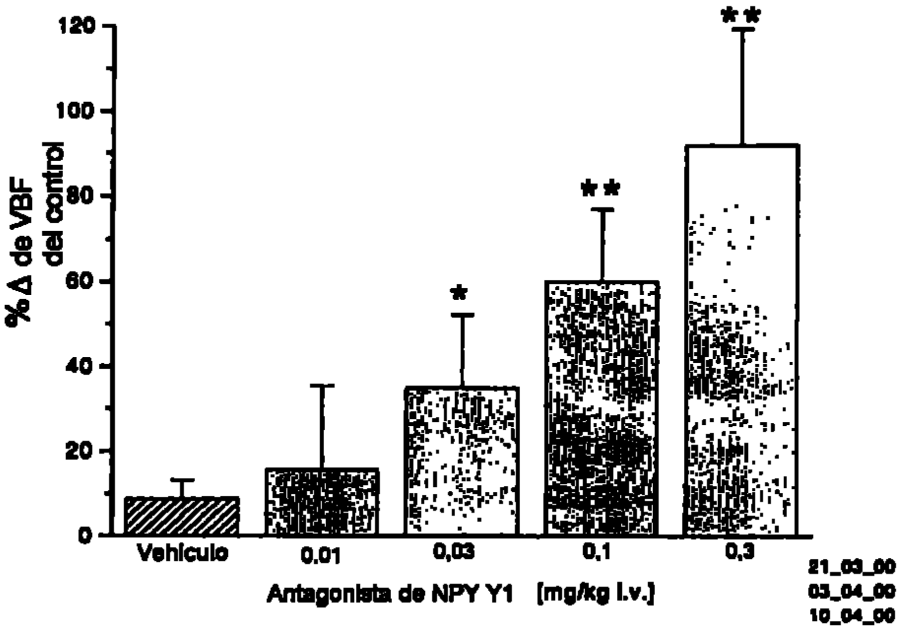
Efecto de un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 sobre los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal



PATRICIA [illegible]
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

Figura 10

Efecto del antagonista de NPY Y1 sobre los aumentos por estimulación del nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal

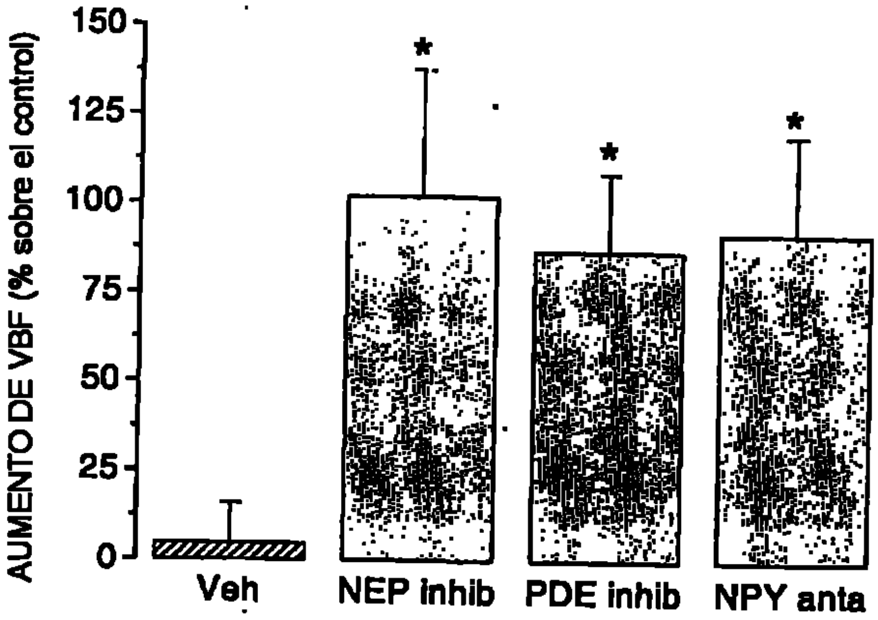


[illegible] MORENO
INGL[illegible] Y [illegible]
c. Cartagena, 113
Teléf. 519[illegible] - MADRID

1495

Figura 11

La estimulación de la señalización de cAMP potencia los aumentos mediados por el nervio del flujo sanguíneo vaginal (VBF) en conejo



1496

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 [illegible] - MADRID

Doña PATRICIA KOCH MORENO, intérprete jurado de inglés y alemán, certifica que la adjunta es traducción fiel y completa al español del documento adjunto redactado en inglés.

En Madrid, a 25 OCT 2000

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 519 [illegible] - MADRID

PCS18343APROV4

1497

INVESTOR IN PEOPLE

The Patent Office
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

I, the undersigned, being an officer duly authorised in accordance with Section 74(1) and (4) of the Deregulation & Contracting Out Act 1994, to sign and issue certificates on behalf of the Comptroller-General, hereby certify that annexed hereto is a true copy of the documents as originally filed in connection with the patent application identified therein.

In accordance with the Patents (Companies Re-registration) Rules 1982, if a company named in this certificate and any accompanying documents has re-registered under the Companies Act 1980 with the same name as that with which it was registered immediately before re-registration save for the substitution as, or inclusion as, the last part of the name of the words "public limited company" or their equivalents in Welsh, references to the name of the company in this certificate and any accompanying documents shall be treated as references to the name with which it is so re-registered.

In accordance with the rules, the words "public limited company" may be replaced by p.l.c., plc, P.L.C. or PLC.

Re-registration under the Companies Act does not constitute a new legal entity but merely subjects the company to certain additional company law rules.

Signed R. Mahoney

Dated 02 August 2000

**Patents Form 1/77**

**Patents Act 1977**
**(Rule 16)**

The Patent Office

1498

&CO

08

THE PATENT OFFICE
05 JUL 2000
RECEIVED BY HAND

[illegible] 0016563.9

**The Patent Office**

Cardiff Road
Newport
Gwent NP9 1RH

## Request for a grant of a patent

*(See the notes on the back of this form you can also get an explanatory leaflet from the Patent Office to help you fill in this form)*

1. Your reference — P00[illegible]GB GTH

2. Patent application number *(The Patent Office will fill in this part)* — **0016563.9** — 05 JUL 2000

3. Full name, address and postcode of the or of each applicant *(underline all surnames)*

Pfizer Limited
Ramsgate Road
Sandwich
Kent
CT13 9NJ

Patents ADP number *(if you know it)* — 1271001

If the applicant is a corporate body, give the country/state of its incorporation — United Kingdom

4. Title of the invention — PHARMACEUTICAL

5. Name of your agent *(if you have one)* — D YOUNG & CO

"Address for service" in the United Kingdom to which all correspondence should be sent (including the postcode)

21 NEW FETTER LANE
LONDON
EC4A 1DA

Patents ADP number *(if you know it)* — 59006

6. If you are declaring priority from one or more earlier patent applications, give the country and date of filing of the or each of these earlier applications and *(if you know it)* the or each application number

| | Country | Priority application number *(if you know it)* | Date of filing *(day/month/year)* |
|---|---|---|---|
| 1st | | | |
| 2nd | | | |
| 3rd | | | |

7. If this application is divided or otherwise derived from an earlier UK application, give the number and filing date of the earlier application

| Number of earlier application | Date of filing (day/month/year) |
|---|---|
| | |

| | | |
|---|---|---|
| 8. | **Is a statment of inventorship and of right to grant of a patent required in support of this request?** *(Answer 'Yes' if:*<br>*a) any applicant named in part 3 is not an inventor, or*<br>*b) there is an inventor who is not named as an applicant, or*<br>*c) any named applicant is a corporate body.*<br>*See note (d))* | YES |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 9. | Enter the number of sheets for any of the following items you are filing with this form. Do not count copies of the same document | Continuation sheets of this form | 0 |
| | | Description | 184 |
| | | Claim(s) | 5 |
| | | Abstract | 1 |
| | | Drawing(s) | (1 + 11 |
| 10. | If you are also filing any of the following, state how many against each item | Priority Documents | 0 |
| | | Translation of Priority Documents | 0 |
| | | Statment of inventorship and right to grant of a patent *(Patents Form 7/77)* | 0 |
| | | Request for preliminary examination and search *(Patents Form 9/77)* | 0 |
| | | Request for substantive examination *(Patents Form 10/77)* | 0 |
| | | Any other documents *(Please specify)* | 0 |

11. **I/We request the grant of a Patent on the basis of this application.**

| Signature | Date |
|---|---|
| D YOUNG & CO<br>Agents for the Applicants | 5 Jul 2000 |

12. Name and daytime telephone number of person to contact in the United Kingdom — Charles Harding — 023 80634816

**Warning**

***After an application for a patent has been filed, the Comptroller of the Patent Office will consider whether publication or communication of the invention should be prohibited or restricted under Section 22 of the Patents Act 1977. You will be informed if it is necessary to prohibit or restrict your invention in this way. Furthermore, if you live in the United Kingdom, Section 23 of the Patents Act 1977 stops you from applying for a patent abroad without first getting written permission from the Patent Office unless an application has been filed at least 6 weeks beforehand in the United Kingdom for a patent for the same invention and either no direction prohibiting publication or communication has been given, or any such direction has been revoked.***

**Notes**

***a) If you need help to fill in this form or you have any questions, please contact the Patent Office on 01645 500505.***

***b) Write your answers in capital letters using black ink or you may type them.***

***c) If there is not enough space for all the relevant details on any part of this form, please continue on a separate sheet of paper and write "see continuation sheet" in the relevant part(s). Any continuation sheets should be attached to this form.***

***d) If you answered 'Yes' Patents Form 7/77 will need to be filed.***

***e) Once you have filled in the form you must remember to sign and date it.***

***f) For details of the fee and ways to pay please contact the Patent Office.***

1499

1507

# PHARMACEUTICAL

## FIELD OF INVENTION

The present invention relates to a pharmaceutical that is useful for the treatment of female sexual dysfunction (FSD), in particular female sexual arousal dysfunction (FSAD).

The present invention also relates to a method of treatment of FSD, in particular FSAD.

The present invention also relates to assays to screen for compounds useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

For convenience, a list of abbreviations that are used in the following text is presented before the Claims section.

## FEMALE SEXUAL RESPONSE

The female sexual response phase of arousal is not easily distinguished from the phase of desire until physiological changes begin to take place in the vagina and clitoris as well as other sexual organs. Sexual excitement and pleasure are accompanied by a combination of vascular and neuromuscular events which lead to engorgement of the clitoris, labia and vaginal wall, increased vaginal lubrication and dilatation of the vaginal lumen (Levin, 1980; Ottesen, 1983; Levin, 1991; Levin, 1992; Sjoberg, 1992; Wagner, 1992; Schiavi *et al.*, 1995; Masters *et al.*, 1996; Berman *et al.*, 1999).

Vaginal engorgement enables transudation to occur and this process is responsible for increased vaginal lubrication. Transudation allows a flow of plasma through the epithelium and onto the vaginal surface, the driving force for which is increased blood flow in the vaginal capillary bed during the aroused state. In addition engorgement leads to an increase in vaginal length and luminal diameter, especially in the distal 2/3 of the vaginal canal. The luminal dilatation of the vagina is due to a combination of smooth muscle relaxation of its wall and skeletal muscle relaxation of the pelvic floor muscles. Some sexual pain disorders such as vaginismus are thought to be due, at least in part, by inadequate relaxation preventing dilatation of the vagina; it

has yet to be ascertained if this is primarily a smooth or skeletal muscle problem. (Levin, 1980; Ottesen, 1983; Levin, 1991; Levin, 1992; Sjoberg, 1992; Wagner, 1992; Schiavi *et al.*, 1995; Master *et al.*, 1996; Berman *et al.*, 1999).

The vasculature and micro vasculature of the vagina are innervated by nerves containing neuropeptides and other neurotransmitter candidates. These include calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NPY), nitric oxide synthase (NOS), substance P and vasoactive intestinal peptide (VIP) (Hoyle *et al.*, 1996). Peptides that are present in the clitoris are discussed *infra*. Nitric oxide synthase, which is often colocalised with VIP, displays a greater expression, immunologically, in the deep arteries and veins rather than in the blood vessels of the propria (Hoyle *et al.*, 1996).

## FEMALE SEXUAL DYSFUNCTION

It is known that some individuals can suffer from female sexual dysfunction (FSD).

FSD is best defined as the difficulty or inability of a woman to find satisfaction in sexual expression. FSD is a collective term for several diverse female sexual disorders (Leiblum, 1998, Berman *et al.*, 1999). The woman may have lack of desire, difficulty with arousal or orgasm, pain with intercourse or a combination of these problems. Several types of disease, medications, injuries or psychological problems can cause FSD.

Studies investigating sexual dysfunction in couples reveals that up to 76% of women have complaints of sexual dysfunction and that 30-50% of women in the USA experience FSD.

Sub-types of FSD include hypoactive sexual desire disorder, sexual arousal disorder, orgasmic disorder and sexual desire disorder.

Treatments in development are targeted to treat specific subtypes of FSD, predominantly desire and arousal disorders.

1500

The categories of FSD are best defined by contrasting them to the phases of normal female sexual response: desire, arousal and orgasm (Leiblum 1998). Desire or libido is the drive for sexual expression – and manifestations often include sexual thoughts either when in the company of an interested partner or when exposed to other erotic stimuli. In contrast, sexual arousal is the vascular response to sexual stimulation, an important component of which is vaginal lubrication and elongation of the vagina. Thus, sexual arousal, in contrast to sexual desire, is a response relating to genital (e.g. vaginal and clitoral) blood flow and not necessarily sensitivity. Orgasm is the release of sexual tension that has culminated during arousal.

Hence, FSD typically occurs when a woman has an inadequate or unsatisfactory response in any of these phases, usually desire, arousal or orgasm. FSD categories include hypoactive sexual desire disorder, sexual arousal disorder, orgasmic disorders and sexual pain disorders.

Hypoactive sexual desire disorder is present if a woman has no or little desire to be sexual, and has no or few sexual thoughts or fantasies. This type of FSD can be caused by low testosterone levels, due either to natural menopause or to surgical menopause. Other causes include illness, medications, fatigue, depression and anxiety.

Female sexual arousal disorder (FSAD) is characterised by inadequate genital response to sexual stimulation. The genitalia (e.g. the vagina and/or the clitoris) do not undergo the engorgement that characterises normal sexual arousal. The vaginal walls are poorly lubricated, so that intercourse is painful. Orgasms may be impeded. Arousal disorder can be caused by reduced oestrogen at menopause or after childbirth and during lactation, as well as by illnesses, with vascular components such as diabetes and atherosclerosis. Other causes result from treatment with diuretics, antihistamines, antidepressants eg SSRIs or antihypertensive agents. FSAD is discussed in more detail *infra*.

Sexual pain disorders (which include dyspareunia and vaginismus) are characterised by pain resulting from penetration and may be caused by medications which reduce lubrication, endometriosis, pelvic inflammatory disease, inflammatory bowel disease or urinary tract problems.

The prevalence of FSD is difficult to gauge because the term covers several types of problem, some of which are difficult to measure, and because the interest in treating FSD is relatively recent. Many women's sexual problems are associated either directly with the female ageing process or with chronic illnesses such as diabetes and hypertension.

There are wide variations in the reported incidence and prevalence of FSD, in part explained by the use of differing evaluation criteria, but most investigators report that a significant proportion of otherwise healthy women have symptoms of one or more of the FSD subgroups. By way of example, studies comparing sexual dysfunction in couples reveal that 63% of women had arousal or orgasmic dysfunction compared with 40% of men have erectile or ejaculatory dysfunction (Frank *et al.*, 1978).

However, the prevalence of female sexual arousal disorder varies considerably from survey to survey. In a recent National Health and Social Life Survey 19% of women reported lubrication difficulties whereas 14% of women in an outpatient gynaecological clinic reported similar difficulties with lubrication (Rosen *et al.*, 1993).

Several studies have also reported dysfunction with sexual arousal in diabetic women (up to 47%), this included reduced vaginal lubrication (Wincze *et al.*, 1993). There was no association between neuropathy and sexual dysfunction.

Numerous studies have also shown that between 11-48% of women overall may have reduced sexual desire with age. Similarly, between 11-50% of women report problems with arousal and lubrication, and therefore experience pain with intercourse. Vaginismus is far less common, affecting approximately 1% of women.

Studies of sexually experienced women have detailed that 5-10% have primary anorgasmia. Another 10% have infrequent orgasms and a further 10% experience them inconsistently (Spector *et al.*, 1990).

Because FSD consists of several subtypes that express symptoms in separate phases of the sexual response cycle, there is not a single therapy. Current treatment of FSD focuses principally on psychological or relationship issues. Treatment of FSD is gradually evolving as more clinical and basic science studies are dedicated to the investigation of this medical problem. Female sexual complaints are not all psychological in pathophysiology, especially for those individuals who may have a component of vasculogenic dysfunction (eg FSAD) contributing to the overall female sexual complaint. There are at present no drugs licensed for the treatment of FSD. Empirical drug therapy includes oestrogen administration (topically or as hormone replacement therapy), androgens or mood-altering drugs such as buspirone or trazodone. These treatment options are often unsatisfactory due to low efficacy or unacceptable side effects.

Since interest is relatively recent in treating FSD pharmacologically, therapy consists of the following:- psychological counselling, over-the-counter sexual lubricants, and investigational candidates, including drugs approved for other conditions. These medications consist of hormonal agents, either testosterone or combinations of oestrogen and testosterone and more recently vascular drugs, that have proved effective in male erectile dysfunction. None of these agents has been demonstrated to be very effective in treating FSD.

## FEMALE SEXUAL AROUSAL DISORDER (FSAD)

The sexual arousal response consists of vasocongestion in the pelvis, vaginal lubrication and expansion and swelling of the external genitalia. The disturbance causes marked distress and/or interpersonal difficulty. Studies investigating sexual dysfunction in couples reveals that there is a large number of females who suffer from sexual arousal dysfunction; otherwise known as female sexual arousal disorder (FSAD).

The Diagnostic and Statistical Manual (DSM) IV of the American Psychiatric Association defines Female Sexual Arousal Disorder (FSAD) as being:

> *"a persistent or recurrent inability to attain or to maintain until completion of the sexual activity adequate lubrication-swelling response of sexual excitement. The disturbance must cause marked distress or interpersonal difficulty."*

FSAD is a highly prevalent sexual disorder affecting pre-, peri- and post menopausal (±HRT) women. It is associated with concomitant disorders such as depression, cardiovascular diseases, diabetes and UG disorders.

The primary consequences of FSAD are lack of engorgement/swelling, lack of lubrication and lack of pleasurable genital sensation. The secondary consequences of FSAD are reduced sexual desire, pain during intercourse and difficulty in achieving an orgasm.

It has recently been hypothesised that there is a vascular basis for at least a proportion of patients with symptoms of FSAD (Goldstein *et al.*, 1998) with animal data supporting this view (Park *et al.*, 1997).

Drug candidates for treating FSAD, which are under investigation for efficacy, are primarily erectile dysfunction therapies that promote circulation to the male genitalia. They consist of two types of formulation, oral or sublingual medications (Apomorphine, Phentolamine, Sildenafil), and prostaglandin ($PGE_1$ - Alprostadil) that are injected or administered transurethrally in men, and topically to the genitalia in women.

The present invention seeks to provide an effective means of treating FSD, and in particular FSAD.

## SUMMARY ASPECTS OF THE PRESENT INVENTION

The present invention is based on findings that FSAD is associated with reduced genital blood flow – in particular reduced blood flow in the vagina and/or the clitoris. Hence, treatment of women with FSAD can be achieved by enhancement of genital blood flow with vasoactive agents. In our studies, we have clearly shown that cAMP mediates vaginal and clitoral vasorelaxation and that genital (e.g. vaginal and clitoral) blood flow can be enhanced/potentiated by elevation of cAMP levels. This is a seminal finding.

In this respect, no one has previously proposed that FSAD can be treated in such a way – i.e. by direct or indirect elevation of cAMP levels. Moreover, there are no teachings in the art to suggest that FSAD was associated with a detrimental modulation of cAMP activity and/or levels or that cAMP is responsible for mediating vaginal and clitoral vasorelaxation. Hence, the present invention is even further surprising.

In addition, we have found that by using agents of the present invention it is possible to treat FSAD by increasing genital engorgement – e.g. increased lubrication in the vagina and increased sensitivity in the vagina and clitoris.

Thus, in a broad aspect, the present invention relates to the use of a cAMP potentiator to treat FSD, in particular FSAD.

The present invention is advantageous as it provides a means for restoring a normal sexual arousal response - namely increased genital blood flow leading to vaginal, clitoral and labial engorgement. This will result in increased vaginal lubrication *via* plasma transudation, increased vaginal compliance and increased genital (e.g. vaginal and clitoral) sensitivity. Hence, the present invention provides a means to restore, or potentiate, the normal sexual arousal response.

## DETAILED ASPECTS OF THE PRESENT INVENTION

In one aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient. Here, the composition (like any of the other compositions mentioned herein) may be packaged for subsequent use in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In another aspect, the present invention relates to the use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD.

In a further aspect, the present invention relates to a method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

In a further aspect, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can be used to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: determining whether an agent can directly or indirectly potentiate cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

By way of example, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with a moeity capable of affecting cAMP activity and/or levels; and measuring the activity and/or levels of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

By way of further example, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In a further aspect, the present invention relates to a process comprising the steps of: (a) performing the assay according to the present invention; (b) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP activity; and (c) preparing a quantity of those one or more identified agents.

With this aspect, the agent identified in step (b) may be modified so as to, for example, maximise activity and then step (a) may be repeated. These steps may be repeated until the desired activity or pharmokinetic profile has been achieved.

Thus, in a further aspect, the present invention relates to a process comprising the steps of: (a1) performing the assay according to the present invention; (b1) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP activity, (b2) modifying one or more of said identified agents; (a2) optionally repeating step (a1); and (c) preparing a quantity of those one or more identified agents (i.e. those that have been modified).

In a further aspect, the present invention relates to a method of treating FSD, in particular FSAD, by potentiating *in vivo* cAMP with an agent; wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP in an *in vitro* assay method; wherein the *in vitro* assay method is the assay method according to the present invention.

In a further aspect, the present invention relates to the use of an agent in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of FSD, in particular FSAD, wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP when assayed *in vitro* by the assay method according to the present invention.

In a further aspect, the present invention relates to an animal model used to identify agents capable of treating FSD (in particular FSAD), said model comprising an anaesthetised female animal including means to measure changes in vaginal and/or clitoral blood flow of said animal following stimulation of the pelvic nerve thereof.

In a further aspect, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSAD, the assay method comprising: administering an agent to the animal model of the present invention; and measuring any potentiation of cAMP and/or increase in blood flow in the vagina and/or clitoris of said animal.

For ease of reference, these and further aspects of the present invention are now discussed under appropriate section headings. However, the teachings under each section are not necessarily limited to each particular section.

## PREFERABLE ASPECTS

Preferably, the agent is for the treatment of FSAD.

Preferably, the agent is a mediator of genital (e.g. vaginal or clitoral) vasorelaxation.

In one embodiment, preferably the agent is for oral administration.

In another embodiment, the agent may be for topical administration.

For some applications, preferably the agent has an indirect potentiating effect on cAMP. Examples of such agents include I:NEP and/or I:NPY. Alternatively expressed, for some applications, preferably the agent does not have a direct potentiating effect on cAMP. It is to be understood that the agent may have an indirect potentiating effect on cAMP by acting on naturally found and laturally located directly acting agents – such as naturally found and located VIP.

For some applications, preferably the agent has a direct potentiating effect on cAMP. Examples of such agents include I:PDE.

For some applications the agent of the present invention may be administered in conjunction with another pharmaceutically active agent. Here the co-administration need not be done at the same time, let alone by the same route. An example of a co-administration composition could be a composition that comprises an agent according to the present invention and an additional agent, wherein the additional agent could have a direct potentiating effect on cAMP. Combination examples are discussed *Infra*.

For some applications, preferably the agent is an inhibitor – i.e. it is capable of exhibiting an inhibitory function.

For some applications, preferably the agent is an I:PDE (sometimes written as PDEi), more preferably an I:PDEII (sometimes written as I:PDE2 or PDEIIi or PDE2i).

For some applications, preferably the agent is a I:NEP (sometimes written as NEPi).

For some applications, preferably the agent is a I:NPY (sometimes written as NPYi).

For some applications, preferably the agent is a selective I:PDEII.

For some applications, preferably the agent is a selective I:NEP.

For some applications, preferably the agent is a selective I:NPY.

For some applications, preferably the agent does not cause - or is administered in such a fashion so that it does not cause – a prolonged drop in blood pressure (e.g. over a period of about 5 minutes or more). In this embodiment, if the agent is to be delivered topically then that agent may have the ability to cause a drop in blood pressure (such as if it were to be delivered intraveneously), provided that in the topical application minimal levels of the agent pass into the blood stream. For an oral agent, it is preferred that the agent does not cause a prolonged drop in blood pressure.

In a preferred aspect, the agent does not cause - or is administered in such a fashion so that it does not cause – a large change in heart rate.

## TREATMENT

It is to be appreciated that all references herein to treatment include one or more of curative, palliative and prophylactic treatment. Preferably, the term treatment includes at least curative treatment and/or palliative tretament.

## FEMALE GENITALIA

The term "female genitalia" is used in accordance with the definition provided in Gray's Anatomy, C.D. Clemente, 13th American Edition – *viz*:

> *"The genital organs consist of an internal and external group. The internal organs are situated within the pelvis and consist of ovaries, the uterine tubes, uterus and the vagina. The external organs are superficial to the urogenital diaphragm and below the pelvic arch. They comprise the mons pubis, the labia majora and minora pudendi, the clitoris, the vestibule, the bulb of the vestibule, and the greater vestibular glands".*

## ENDOGENOUS cAMP

In a highly preferred embodiment the agent of the present invention potentiates endogenous cAMP – such as potentiates endogenous cAMP levels.

Here, the term "endogenous cAMP" means cAMP that arises from sexual stimulation (sexual arousal). Hence, the term does not encompass cAMP levels that will be elevated independent of sexual drive.

Thus, according to the present invention, treatment of FSAD is achieved by directly or indirectly potentiating endogenous cAMP signalling which, in turn, increases vaginal blood flow/lubrication and/or clitoral blood flow; thus enhancing the natural sexual arousal response. Thus, the treatment method of the present invention restores or potentiates the normal arousal response. In the treatment method of the present invention, this result may be achieved by use of an inhibitor of NEP (EC 3.4.24.11) or a cAMP-hydrolysing PDE inhibitor or a NPY receptor antagonist.

An animal test model is provided herein. This animal test model may be used to determine increases of genital blood flow as a result of cAMP potentiation. In this animal model a pelvic nerve is stimulated – which brings on an effect that mimics the physiology of a sexual arousal/response. In these experiments, agents according to the present invention cause an increase in blood flow after the nerve has been stimulated. In the absence of stimulation, the agents have no (or a negligible) effect in causing an increase in blood flow. Typically, in these experiments, the nerve is stimulated in order to obtain a base line increase in blood flow. Then a candidate (or actual) agent is delivered to the animal, such as by the oral route. An increase in blood flow is then indicative of an agent according to the present invention.

## SEXUAL STIMULATION

The present invention also encompasses administration of the agent of the present invention before and/or during sexual stimulation. Here the term "sexual stimulation" may be synonymous with the term "sexual arousal". This aspect of the present invention is advantageous because it provides systemic selectivity. The natural cascade only occurs at the genitalia and not in other locations – e.g. in the heart etc. Hence, it would be possible to achieve a selective effect on the genitalia.

Thus, for some aspects of the present invention it is highly desirable that there is a sexual stimulation step. We have found that this step can provide systemic selectivity. Here, "sexual stimulation" may be one or more of a visual stimulation, a physical stimulation, an auditory stimulation, or a thought stimulation.

Thus, preferably the agents of the present invention are delivered before or during sexual stimulation, particulaly when those agents are for oral delivery.

Hence, for this preferred aspect, the present invention provides for the use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; and wherein said female is sexually stimulated before or during administration of said medicament.

Preferably, the present invention provides for the use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein said female is sexually stimulated before or during administration of said medicament; and wherein said medicament is delivered orally to said female.

In addition, for this preferred aspect, the present invention provides for a method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said female is sexually stimulated before or during administration of said agent.

Preferably, the present invention provides for a method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; wherein said female is sexually stimulated before or during administration of said agent; and wherein said agent is delivered orally to said female.

POTENTIATING cAMP

As used herein with reference to cAMP, the term "potentiating" includes any one or more of: increasing the effectiveness of cAMP, increasing the levels of cAMP, increasing the activity of cAMP, decreasing the level of cAMP degradation, decreasing the level of cAMP inhibition.

The potentiating effect can be a direct effect. An example of a direct effect would be upregulation of cAMP levels by an agent that increases the expression thereof.

Alternatively, the potentiating effect could be an indirect effect. An example of such an effect would be action on a substance that would otherwise inhibit and/or reduce the levels and/or activity of cAMP. Another example of such an effect would be increasing the action of a substance that increases the effectiveness of cAMP, increases the levels of cAMP, increases the activity of cAMP, decreases the level of cAMP degradation, or decreases the level of cAMP inhibition.

An example of a PcAMP would be I:PDE, such as I:PDEII.

cAMP Mimetic

For some aspects of the present invention, the agent may act as a cAMP mimetic.

As used herein, the term "cAMP mimetic" means an agent that can act in a similar fashion (e.g. have a similar biological profile and effect) to cAMP in the female sexual genitalia and, in doing so, does any one or more of: increases the effectiveness of cAMP like moieties, increases the levels of cAMP like moieties, increases the activity of cAMP like moieties, decreases the level of degradation of cAMP like moieties, decreases the level of inhibition of cAMP like moieties.

Thus, in one aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

Thus, in another aspect, the present invention relates to the use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

Thus, in a further aspect, the present invention relates to a method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to potentiate cAMP levels in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

An example of a cAMP mimetic would be forskolin. Here we have found that forskolin increases vaginal and clitoral blood flow and it can also act as a vaginal relaxant.

In a preferred aspect, the cAMP mimetic is administered orally.

## ACTIVATOR OF cAMP

As used herein, the term "activator of cAMP" means a substance that controls or releases cAMP in the female sexual genitalia. The control may be direct (e.g. on cAMP itself) or indirect (e.g. via activation of cAMP). For ease of reference, we refer to these substances as $A_{cAMP}$.

## TARGET

The term "target" as used herein with reference to the present invention means any substance that is cAMP, an $A_{cAMP}$, an $I_{cAMP}$, or an $AM_{cAMP}$. Otherwise expressed, the target can be referred to as a $P_{cAMP}$ target.

The target for the agent of the present invention may be an amino acid sequence and/or a nucleotide sequence encoding same and/or an expression unit responsible for the expression of same and/or a modulator of same.

The target may even be a combination of such targets.

AGENT

The agent may be any suitable agent that can act as a $P_{cAMP}$.

The agent can be an amino acid sequence or a chemical derivative thereof. The substance may even be an organic compound or other chemical. The agent may even be a nucleotide sequence - which may be a sense sequence or an anti-sense sequence. The agent may even be an antibody.

Thus, the term "agent" includes, but is not limited to, a compound which may be obtainable from or produced by any suitable source, whether natural or not.

The agent may be designed or obtained from a library of compounds which may comprise peptides, as well as other compounds, such as small organic molecules, such as lead compounds.

By way of example, the agent may be a natural substance, a biological macromolecule, or an extract made from biological materials such as bacteria, fungi, or animal (particularly mammalian) cells or tissues, an organic or an inorganic molecule, a synthetic agent, a semi-synthetic agent, a structural or functional mimetic, a peptide, a peptidomimetics, a derivatised agent, a peptide cleaved from a whole protein, or a peptides synthesised synthetically (such as, by way of example, either using a peptide synthesizer or by recombinant techniques or combinations thereof, a recombinant agent, an antibody, a natural or a non-natural agent, a fusion protein or equivalent thereof and mutants, derivatives or combinations thereof.

As used herein, the term "agent" may be a single entity or it may be a combination of agents.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:NEP – that organic compound may typically comprise an amide group (i.e. –N(H)-C(O)- or even –C(O)-N(H)-) and one or more hydrocarbyl groups. Here, the term "hydrocarbyl group" means a group comprising at least C and H and may optionally comprise one or more other suitable substituents. Examples of such substituents may include halo-, alkoxy-, nitro-, an alkyl group, a cyclic group etc. In addition to the possibility of the substituents being a cyclic group, a combination of substituents may form a cyclic group. If the hydrocarbyl group comprises more than one C then those carbons need not necessarily be linked to each other. For example, at least two of the carbons may be linked *via* a suitable element or group. Thus, the hydrocarbyl group may contain hetero atoms. Suitable hetero atoms will be apparent to those skilled in the art and include, for instance, sulphur, nitrogen and oxygen. For some applications, preferably the agent comprises at least one cyclic group. For some applications, preferably the agent comprises at least one cyclic group linked to another hydrocarbyl group via an amide bond. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:PDE – that organic compound may typically comprise two or more linked hydrocarbyl groups. For some applications, preferably the agent comprises at least two cyclic groups – wherein one of which cyclic groups may be a fused cyclic ring structure. For some applications, preferably at least one of the cyclic groups is a heterocyclic group. For some applications, preferably the heterocyclic group comprises at least one N in the ring. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:NPY – that organic compound may typically comprise two or more linked hydrocarbyl groups. For some applications, preferably the agent comprises at least two cyclic groups – optionally wherein one of which cyclic groups may be a fused cyclic ring structure. For some applications, at least one of the cyclic groups is a heterocyclic group. For some applications, preferably the heterocyclic group comprises at least one N in the ring. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

The agent may contain halo groups. Here, "halo" means fluoro, chloro, bromo or iodo.

The agent may contain one or more of alkyl, alkoxy, alkenyl, alkylene and alkenylene groups – which may be unbranched- or branched-chain.

The agent may be in the form of a pharmaceutically acceptable salt – such as an acid addition salt or a base salt – or a solvate thereof, including a hydrate thereof. For a review on suitable salts see Berge et al, J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19.

Suitable acid addition salts are formed from acids which form non-toxic salts and examples are the hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, sulphate, bisulphate, nitrate, phosphate, hydrogen phosphate, acetate, maleate, fumarate, lactate, tartrate, citrate, gluconate, succinate, saccharate, benzoate, methanesulphonate, ethanesulphonate, benzenesulphonate, p-toluenesulphonate and pamoate salts.

Suitable base salts are formed from bases which form non-toxic salts and examples are the sodium, potassium, aluminium, calcium, magnesium, zinc and diethanolamine salts.

A pharmaceutically acceptable salt of an agent of the present invention may be readily prepared by mixing together solutions of the agent and the desired acid or base, as appropriate. The salt may precipitate from solution and be collected by filtration or may be recovered by evaporation of the solvent.

The agent of the present invention may exisit in polymorphic form.

The agent of the present invention may contain one or more asymmetric carbon atoms and therefore exists in two or more stereoisomeric forms. Where an agent contains an alkenyl or alkenylene group, cis (E) and trans (Z) isomerism may also occur. The present invention includes the individual stereoisomers of the agent and, where appropriate, the individual tautomeric forms thereof, together with mixtures thereof.

Separation of diastereoisomers or cis and trans isomers may be achieved by conventional techniques, e.g. by fractional crystallisation, chromatography or H.P.L.C. of a stereoisomeric mixture of the agent or a suitable salt or derivative thereof. An individual enantiomer of the agent may also be prepared from a corresponding optically pure intermediate or by resolution, such as by H.P.L.C. of the corresponding racemate using a suitable chiral support or by fractional crystallisation of the diastereoisomeric salts formed by reaction of the corresponding racemate with a suitable optically active acid or base, as appropriate.

The present invention also includes all suitable isotopic variations of the agent or a pharmaceutically acceptable salt thereof. An isotopic variation of an agent of the present invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof is defined as one in which at least one atom is replaced by an atom having the same atomic number but an atomic mass different from the atomic mass usually found in nature. Examples of isotopes that can be incorporated into the agent and pharmaceutically acceptable salts thereof include isotopes of hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, phosphorus, sulphur, fluorine and chlorine such as $^{2}H$, $^{3}H$, $^{13}C$, $^{14}C$, $^{15}N$, $^{17}O$, $^{18}O$, $^{31}P$, $^{32}P$, $^{35}S$, $^{18}F$ and $^{36}Cl$, respectively. Certain isotopic variations of the agent and pharmaceutically acceptable salts thereof, for example, those in which a radioactive isotope such as $^{3}H$ or $^{14}C$ is incorporated, are useful in drug and/or substrate tissue distribution studies. Tritiated, i.e., $^{3}H$, and carbon-14, i.e., $^{14}C$, isotopes are particularly preferred for their ease of preparation and detectability. Further, substitution with isotopes such as deuterium, i.e., $^{2}H$, may afford certain therapeutic advantages resulting from greater metabolic stability, for example, increased *in vivo* half-life or reduced dosage requirements and hence may be preferred in some circumstances. Isotopic variations of the agent of the present invention and pharmaceutically acceptable salts thereof of this invention can generally be prepared by conventional procedures using appropriate isotopic variations of suitable reagents.

It will be appreciated by those skilled in the art that the agent of the present invention may be derived from a prodrug. Examples of prodrugs include entities that have certain protected group(s) and which may not possess pharmacological activity as such, but may, in certain instances, be administered (such as orally or parenterally) and thereafter metabolised in the body to form the agent of the present invention which are pharmacologically active.

It will be further appreciated that certain moieties known as "pro-moieties", for example as described in "Design of Prodrugs" by H. Bundgaard, Elsevier, 1985 (the disclosured of which is hereby incorporated by reference), may be placed on appropriate functionalities of the agents. Such prodrugs are also included within the scope of the invention.

The $P_{cAMP}$ may do any one or more of: directly or indirectly increase the effectiveness of cAMP, directly or indirectly increase the levels of cAMP, directly or indirectly increase the activity of cAMP, directly or indirectly decrease the level of cAMP degradation, directly or indirectly decrease the level of cAMP inhibition.

Preferably, the agent directly or indirectly increases cAMP levels in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

More preferably, the agent directly or indirectly selectively increases cAMP levels in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

More preferably, the agent directly or indirectly selectively increases cAMP levels wherein said cAMP is sexually arousal induced cAMP.

In a highly preferred aspect, the agent of the present invention increases the relative amount of sexual arousal induced cAMP.

For some applications, the agent selectively treats FSAD.

In one aspect, the agent may inhibit or antagonise a suitable target and in doing so potentiate cAMP levels in the female sexual genitalia. In the text, we have used the term inhibitor to mean an inhibitor and/or antagonist.

In another aspect, the agent may activate or agonise a suitable target and in doing so potentiate cAMP levels in the female sexual genitalia. In the text, we have used the terms activator and upregulator inhibitor to mean activator and/or upregulator and/or agonist.

Thus, the agent may agonise, antagonise, upregulate, or inhibit a suitable target.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

Preferably, the agent may selectively agonise, selectively antagonise, selectively upregulate, or selectively inhibit a suitable target.

Preferably, the agent may selectively agonise, selectively antagonise, selectively upregulate, or selectively inhibit a selective, suitable target.

The agent of the present invention may also be capable of displaying one or more other beneficial functional properties. By way of example, the agent of the present invention may potentiate cAMP as well as potentiating cGMP.

For some applications (such as a topical application), the agent may also display an ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitory action. An ACE assay is presented in the Experimental Section herein. For some applications (such as with particular patient types), such agents (i.e. those that also display ACE inhibitory action) may not be suitable for oral administration.

For some applications, the agent may also display an ECE (endothelium converting enzyme) inhibitory action. ECE assays are well known in the art.

## PHARMACEUTICAL COMBINATIONS

The agent may be used in combination with one or more other pharmaceutically active agents, such as a PcGMP (such a phosphodiestertase type 5 inhibitor eg Sildenafil, or a nitric oxide donor, or a nitric oxide precursor eg L-argininse) and/or a centrally acting pharmaceutical (e.g. a dopamine receptor or melanocortin receptor agonist, such as apomorphine or melanotan II). Teachings on the use of apomorphine as a pharmaceutical may be found in US-A-5945117. In that particular document, apomorphine is delivered sub-lingually. In addition, or in the alternative, the agent may be used in combination with one or more of: a PDE5 inhibitor (eg sildenafil, vardenafil (Bayer BA 38-9456) and IC351 (Cialis, Icos Lilly)), one or more of a nitric oxide donor (eg NMI-921), one or more of a dopamine receptor agonist (eg apomorphine, Uprima, Ixsene), one or more of a melanocortin receptor agonist (eg Melanotan II or PT14), one or more of a potassium channel opener (eg a $K_{ATP}$ channel opener (eg minoxidil, nicorandil) and/or a calcium activated potassium channel opener (eg BMS-204352), one or more of a a1-adrenoceptor antagonist (eg phentolamine, Vasofem, Vasomax), one or more of a VIP receptor agonist or a VIP analogue (eg Ro-125-1553) or a VIP fragment, one or more of a α-adrenoceptor antagonist with VIP combination (eg Invicorp, Aviptadil), one or more of a α2-adrenoceptor antagonist (eg yohimbine), one or more of a estrogen, estrogen and medroxyprogesterone or medroxyprogesterone acetate (MPA) or oestrogen and methyl testosterone hormone replacement therapy agent (eg HRT especially Premarin, Cenestin, Oestrofeminal, Equin, Estrace, Estrofem, Elleste Solo, Estring, Eastraderm, Eastraderm TTS, Eastraderm Matrix, Dermestril, Premphase, Prempro, Prempak, Premique, Estratest, Estratest HS, Tibolone), one or more of a testosterone replacement agent (inc DHEA (dehydroandrostendione), testosterone (Tostrelle) or a testosterone implant (Organon)), one or more of a testosterone/oestradiol agent one or more of an estrogen agonists, one or more of a serotonin receptor agonist or antagonist (eg 5HT1A, 5HT2C, 5HT2A and 5HT3 receptor agonists and antagonists; as described in WO2000/28993), one or more of a prostanoid receptor agonist (eg Muse, alprostadil, misoprostol), one or more of a purinergic receptor agonist (especially P2Y2 and P2Y4) one or more antidepressant agents (eg bupropion (Wellbutrin), mirrtazapine, nefazodone).

If a combination of active agents are administered, then they may be administered simultaneously, separately or sequentially.

## VIP COMBINATION

According to the present invention, the agent is not VIP (or preferably not an analogue thereof or a fragment thereof). However, for some embodiments, the agent of the present invention may be co-administered with VIP or an analogue thereof or a fragment thereof.

In a highly preferred aspect, VIP or an analogue thereof or a fragment thereof is not administered. This is because there has been a report that VIP infusions lead to significant cardiovascular adverse effects such as increases in heart rate and a decrease in diastolic arterial blood pressure (Ottesen 1983, 1987, 1995)

In addition, and even though, Ottesen and co-workers have demonstrated that VIP induces increases in vaginal blood flow and lubrication in healthy volunteers, the mechanism by which VIP is exerting it's effects are unclear. In the literature, there are a number of examples of VIP signalling through different second messenger systems eg cGMP/guanylate cyclase (Ashur-Fabian, 1999); carbon monoxide (CO)/heme oxygenase (Fan et al.,1998) and cAMP/adenylate cyclase (Foda,1995; Schoeffter, 1985; Gu, 1992). This is exemplified by a recent report which describes how the vasorelaxant effects of VIP in the uterine artery can be explained by the release of nitric oxide. (Jovanovic, 1998). Again, there is also evidence for VIP modulating nitric oxide (NO)/cGMP in male urogenital function (Kim, 1994).

Furthermore, in the literature it has been reported that VIP has no effect on cAMP levels in vaginal smooth muscle cell cultures (see Traish, A., Moreland, R.B., Huang, Y., *et al.* (1999). Development of human and rabbit vaginal smooth muscle cell cultures: Effects of vasoactive agents on intracellular levels of cyclic nucleotides. *Mol. Cell Biol. Res. Comm.*, **2**, 131-137).

Moreover, in follow up studies, Ottesen and co-workers (see Palle, Bredkjaer, Ottesen and Fahrenkrug 1990 Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology vol 17 61-68), report that the effect of VIP on vaginal blood flow irrespective of the route of administration is part of a systemic vasodilatory effect rather than a local response. In addition, they report on a number of vascular side effects associated with VIP – *viz* flushing, hypotension and tachycardia.

## $K_i$ VALUES

For some applications, preferably the agent of the present invention has a $K_i$ value of less than about 100 nM, preferably less than about 75 nM, preferably less than about 50 nM, preferably less than about 25 nM, preferably less than about 20 nM, preferably less than about 15 nM, preferably less than about 10 nM, preferably less than about 5 nM.

## $K_b$ VALUES

For some applications, preferably the agent of the present invention has a $K_b$ value of less than about 100 nM, preferably less than about 75 nM, preferably less than about 50 nM, preferably less than about 25 nM, preferably less than about 20 nM, preferably less than about 15 nM, preferably less than about 10 nM, preferably less than about 5 nM.

## $K_a$ VALUES

For some applications, preferably the agent of the present invention has a $K_a$ value of less than about 100 nM, preferably less than about 75 nM, preferably less than about 50 nM, preferably less than about 25 nM, preferably less than about 20 nM, preferably less than about 15 nM, preferably less than about 10 nM, preferably less than about 5 nM.

## PHARMOKINETICS

For some embodiments of the present invention, preferably the agents of the present invention (e.g. I:NEP inhibitors) have a log D of -2 to +4, more preferably -1 to +2. The log D can be determined by standard procedures known in the art such as described in J. Pharm. Pharmacol. 1990, 42:144.

In addition, or in the alternative, for some embodiments preferably the agents of the present invention (e.g. I:NEP) have a caco-2 flux of greater than $2x10^{-6}cms^{-1}$, more preferably greater than $5x10^{-6}cms^{-1}$. The caco flux value can be determined by standard procedures known in the art such as described in J. Pharm. Sci 79, 7, p595-600 (1990), and Pharm. Res. vol 14, no. 6 (1997).

## SELECTIVITY

For some applications, preferably the agent of the present invention has at least about a 100 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 150 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 200 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 250 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 300 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 350 fold selectivity to the desired target.

For some applications, preferably the agent of the present invention has at least about a 400 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 500 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 600 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 700 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 800 fold selectivity to the desired target, preferably at least

1511
1747

about a 900 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 1000 fold selectivity to the desired target.

CHEMICAL SYNTHESIS METHODS

Typically the agent of the present invention will be prepared by chemical synthesis techniques.

The agent or target of the present invention or variants, homologues, derivatives, fragments or mimetics thereof may be produced using chemical methods to synthesize the agent in whole or in part. For example, peptides can be synthesized by solid phase techniques, cleaved from the resin, and purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g., Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY). The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman degradation procedure; Creighton, *supra*).

Direct synthesis of the agent or variants, homologues, derivatives, fragments or mimetics thereof can be performed using various solid-phase techniques (Roberge JY *et al* (1995) Science 269: 202-204) and automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 43 1 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) in accordance with the instructions provided by the manufacturer. Additionally, the amino acid sequences comprising the agent or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with a sequence from other subunits, or any part thereof, to produce a variant agent, such as, for example, a variant PDE, NEP or NPY.

In an alternative embodiment of the invention, the coding sequence of the agent or variants, homologues, derivatives, fragments or mimetics thereof may be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers MH *et al* (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23, Horn T *et al* (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

## MIMETIC

As used herein, the term "mimetic" relates to any chemical which includes, but is not limited to, a peptide, polypeptide, antibody or other organic chemical which has the same qualitative activity or effect as a reference agent to target.

## CHEMICAL DERIVATIVE

The term "derivative" or "derivatised" as used herein includes chemical modification of an agent. Illustrative of such chemical modifications would be replacement of hydrogen by a halo group, an alkyl group, an acyl group or an amino group.

## CHEMICAL MODIFICATION

In one embodiment of the present invention, the agent may be a chemically modified agent.

The chemical modification of an agent of the present invention may either enhance or reduce hydrogen bonding interaction, charge interaction, hydrophobic interaction, Van Der Waals interaction or dipole interaction between the agent and the target.

In one aspect, the identified agent may act as a model (for example, a template) for the development of other compounds.

## RECOMBINANT METHODS

Typically the target of the present invention for use in the assay of the present invention may be prepared by recombinant DNA techniques.

## POTENTIATING cGMP

As used herein with reference to cGMP, the term "potentiating" includes any one or more of: increasing the effectiveness .of cGMP, increasing the levels of cGMP, increasing the activity of cGMP, decreasing the level of cGMP degradation; decreasing the level of cGMP inhibition.

The potentiating effect can be a direct effect. Alternatively, it could be a secondary effect and/or a downstream effect.

Here, preferably, the agent that potentiates cGMP acts on a $I_{cGMP}$ and/or an $AM_{cGMP}$ wherein the modulator of cGMP has an adverse effect on cGMP, such that the agent reduces and/or eliminates and/or masks and/or diverts the detrimental effect of the $I_{cGMP}$ and/or the $AM_{cGMP}$ towards cGMP.

Hence, the present invention encompasses a combination of one or more $I:I_{cAMP}$ and one or more $I:I_{cGMP}$.

In one aspect, the $I:I_{cGMP}$ is a $I:PDE_{cGMP}$.

## $I_{cAMP}$ AND/OR $AM_{cAMP}$

We have shown that cAMP mediates genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow and by enhancing cAMP signalling we can enhance genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow in an animal model. Thus, an agent that upregulates/enhances cAMP-mediated vasorelaxation will be efficacious in the treatment of FSAD. For ease of reference, we refer to these substances as $I_{cAMP}$ and/or an $AM_{cAMP}$. Here, the $I_{cAMP}$ and the $AM_{cAMP}$ have an adverse effect on cAMP levels or activity.

Thus, the agent may be any one of more of: an $I:I_{cAMP}$ and/or an $I:AM_{cAMP}$.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

Examples of $I_{cAMP}$ and the $AM_{cAMP}$ include one or more of PDE(s), NPY and NEP, or any component associated therewith. The associated component may be, for example, a receptor and/or a co-factor.

Thus, preferably the agent may be any one of more of: an $I:PDE_{cAMP}$, an I:NPY (sometimes written as NPYi), an I:NPY $Y_n$ (sometimes written as NPY $Y_n$I), and I:NEP.

Likewise, the agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

## $I:I_{cAMP}$ AND/OR $I:AM_{cAMP}$

In accordance with the present invention we have found that it is possible to treat and/or prevent FSAD by using an agent that reduces and/or eliminates and/or masks and/or diverts and/or prevents the detrimental effect of the $I_{cAMP}$ and/or the $AM_{cAMP}$ towards cAMP. The agent may even restore cAMP levels that were decreased by the a $I_{cAMP}$ and/or a $AM_{cAMP}$. For ease, we refer to these substances as $I:I_{cAMP}$ and/or a $I:AM_{cAMP}$. Here, the $I:I_{cAMP}$ and the $I:AM_{cAMP}$ prevent or reduce the adverse effect on cAMP levels or activity.

Thus, in one preferred aspect, the agent is an $I:I_{cAMP}$ and/or an $I:AM_{cAMP}$ wherein the $AM_{cAMP}$ has a detrimental effect on $AM_{cAMP}$.

In a preferred aspect, the agent may be one or more of:

$I:PDE_{cAMP}$
$I:PDEn_{cAMP}$ (where n denotes an appropriate class or sub-class)
I:NPY
I:NPY $Y_n$ (where n denotes an appropriate class or sub-class)I:NEP

## $A_{cAMP}$

In accordance with the present invention, we have found that one of the important causes of FSAD is due to low levels or low activity of cAMP in the female genitalia.

Thus, the agent may be a $U:A_{cAMP}$.

Examples of $A_{cAMP}$ include VIP and AC, or any component associated therewith. The associated component may be, for example, a receptor and/or a co-factor.

Thus, preferably the agent may be any one of more of: A:AC, A:VIPr, A:$VIP_n$, I:I:VIPr or I:I:$VIP_n$.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

## U:A$_{cAMP}$

In another respect, preferably, the target is a component that increases the level of cAMP. Hence, the agent can be an U:AC

By way of example, the target could be cAMP itself or AC or VIP (or combinations thereof).

Hence, by way of example, the agent can be any one of : an U:A$_{cAMP}$, an A:AC, an A:VIPr, an A:VIP$_n$, an I:I:VIPr or an I:I:VIP$_n$.

## COMBINATION OF I:I$_{cAMP}$ AND/OR I:M$_{cAMP}$ AND/OR U:A$_{cAMP}$

In another aspect, the agent of the present invention may even be a combination of cAMP potentiators. By way of example, the agent of the present invention may be two or more of:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$.

## COMBINATION OF cAMP Mimetic and I:I$_{cAMP}$ AND/OR I:M$_{cAMP}$ AND/OR U:A$_{cAMP}$

In another aspect, the agent of the present invention may even be a combination of a cAMP mimetic and one or more cAMP potentiators. By way of example, the agent of the present invention may be a cAMP mimetic and one or more of:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$.

## INHIBITOR

The term "inhibitor" as used herein with respect to the agent of the present invention means an agent that can reduce and/or eliminate and/or mask and/or prevent the detrimental action of a I$_{cAMP}$ and/or a detrimental M$_{cAMP}$ towards cAMP. The inhibitor may act as an antagonist.

## ACTIVATOR

The term "activator" as used herein with respect to the agent of the present invention means an agent that can increase and/or produce and/or unmask and/or elevate and/or ensure action of cAMP and/or an A$_{cAMP}$. The activator may act as an agonist.

## OTHER ACTIVE COMPONENTS

In another aspect, the agent of the present invention may even be in combination with one or more other active components - such as one or more agents capable of potentiating cGMP.

1574
1575

AMINO ACID SEQUENCE

As used herein, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "polypeptide" and/or the term "protein". In some instances, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "peptide". In some instances, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "protein".

The amino acid sequence may be prepared isolated from a suitable source, or it may be made synthetically or it may be prepared by use of recombinant DNA techniques.

In one aspect, the present invention provides an amino acid sequence that is capable of acting as a target in an assay for the identification of one or more agents and/or derivatives thereof capable of affecting the amino acid sequence in order to potentiate cAMP to treat FSAD.

NUCLEOTIDE SEQUENCE

As used herein, the term "nucleotide sequence" is synonymous with the term "polynucleotide".

The nucleotide sequence may be DNA or RNA of genomic or synthetic or of recombinant origin. The nucleotide sequence may be double-stranded or single-stranded whether representing the sense or antisense strand or combinations thereof.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is DNA.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is prepared by use of recombinant DNA techniques (e.g. recombinant DNA).

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is cDNA.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence may be the same as the naturally occurring form for this aspect.

In one aspect, the present invention provides a nucleotide sequence encoding a substance capable of acting as a target in an assay (such as a yeast two hybrid assay) for the identification of one or more agents and/or derivatives thereof capable of affecting the substance in order to potentiate cAMP to treat FSAD.

It will be understood by a skilled person that numerous different nucleotide sequences can encode the targets of the present invention as a result of the degeneracy of the genetic code. In addition, it is to be understood that skilled persons may, using routine techniques, make nucleotide substitutions that do not substantially affect the activity encoded by the nucleotide sequence of the present invention to reflect the codon usage of any particular host organism in which the target of the present invention is to be expressed. Thus, the terms "variant", "homologue" or "derivative" in relation to the nucleotide sequence set out in the attached sequence listings include any substitution of, variation of, modification of, replacement of, deletion of or addition of one (or more) nucleic acid from or to the sequence providing the resultant nucleotide sequence encodes a functional target according the present invention (or even an agent according to the present invention if said agent comprises a nucleotide sequence or an amino acid sequence).

As indicated above, with respect to sequence homology, preferably there is at least 75%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90% homology to the sequences shown in the sequence listing herein. More preferably there is at least 95%, more preferably at least 98%, homology. Nucleotide homology comparisons may be conducted as described above. A preferred sequence comparison program is the GCG Wisconsin Bestfit program described above. The default scoring matrix has a match value of 10 for each identical nucleotide and -9 for each mismatch. The default gap creation penalty is -50 and the default gap extension penalty is -3 for each nucleotide.

The present invention also encompasses nucleotide sequences that are capable of hybridising selectively to the sequences presented herein, or any variant, fragment or derivative thereof, or to the complement of any of the above. Nucleotide sequences are preferably at least 15 nucleotides in length, more preferably at least 20, 30, 40 or 50 nucleotides in length. These sequences could be used a probes, such as in a diagnostic kit.

1515
1156

## VARIANTS/HOMOLOGUES/DERIVATIVES

In addition to the specific amino acid sequences and nucleotide sequences mentioned herein, the present invention also encompasses the use of variants, homologue and derivatives thereof. Here, the term "homology" can be equated with "identity".

In the present context, an homologous sequence is taken to include an amino acid sequence which may be at least 75, 85 or 90% identical, preferably at least 95 or 98% identical. In particular, homology should typically be considered with respect to those regions of the sequence known to be essential for an activity. Although homology can also be considered in terms of similarity (i.e. amino acid residues having similar chemical properties/functions), in the context of the present invention it is preferred to express homology in terms of sequence identity.

Homology comparisons can be conducted by eye, or more usually, with the aid of readily available sequence comparison programs. These commercially available computer programs can calculate % homology between two or more sequences.

% homology may be calculated over contiguous sequences, i.e. one sequence is aligned with the other sequence and each amino acid in one sequence is directly compared with the corresponding amino acid in the other sequence, one residue at a time. This is called an "ungapped" alignment. Typically, such ungapped alignments are performed only over a relatively short number of residues.

Although this is a very simple and consistent method, it fails to take into consideration that, for example, in an otherwise identical pair of sequences, one insertion or deletion will cause the following amino acid residues to be put out of alignment, thus potentially resulting in a large reduction in % homology when a global alignment is performed. Consequently, most sequence comparison methods are designed to produce optimal alignments that take into consideration possible insertions and deletions without penalising unduly the overall homology score. This is achieved by inserting "gaps" in the sequence alignment to try to maximise local homology.

However, these more complex methods assign "gap penalties" to each gap that occurs in the alignment so that, for the same number of identical amino acids, a sequence alignment with as few gaps as possible - reflecting higher relatedness between the two compared sequences - will achieve a higher score than one with many gaps. "Affine gap costs" are typically used that charge a relatively high cost for the existence of a gap and a smaller penalty for each subsequent residue in the gap. This is the most commonly used gap scoring system. High gap penalties will of course produce optimised alignments with fewer gaps. Most alignment programs allow the gap penalties to be modified. However, it is preferred to use the default values when using such software for sequence comparisons. For example when using the GCG Wisconsin Bestfit package (see below) the default gap penalty for amino acid sequences is -12 for a gap and -4 for each extension.

Calculation of maximum % homology therefore firstly requires the production of an optimal alignment, taking into consideration gap penalties. A suitable computer program for carrying out such an alignment is the GCG Wisconsin Bestfit package (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Examples of other software than can perform sequence comparisons include, but are not limited to, the BLAST package (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* – Chapter 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 403-410) and the GENEWORKS suite of comparison tools. Both BLAST and FASTA are available for offline and online searching (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, pages 7-58 to 7-60). However it is preferred to use the GCG Bestfit program. A new tool, called BLAST 2 Sequences is also available for comparing protein and nucleotide sequence (see FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 and tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Although the final % homology can be measured in terms of identity, the alignment process itself is typically not based on an all-or-nothing pair comparison. Instead, a scaled similarity score matrix is generally used that assigns scores to each pairwise comparison based on chemical similarity or evolutionary distance. An example of such a matrix commonly used is the BLOSUM62 matrix - the default matrix for the BLAST suite of programs. GCG Wisconsin programs generally use either the public default values or a custom symbol comparison table if supplied (see user manual for further details). It is preferred to use the public default values for the GCG package, or in the case of other software, the default matrix, such as BLOSUM62.

Once the software has produced an optimal alignment, it is possible to calculate % homology, preferably % sequence identity. The software typically does this as part of the sequence comparison and generates a numerical result.

The sequences may also have deletions, insertions or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent substance. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues as long as the secondary binding activity of the substance is retained. For example, negatively charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine, valine, glycine, alanine, asparagine, glutamine, serine, threonine, phenylalanine, and tyrosine.

Conservative substitutions may be made, for example according to the Table below. Amino acids in the same block in the second column and preferably in the same line in the third column may be substituted for each other:

| | | |
|---|---|---|
| ALIPHATIC | Non-polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar - uncharged | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar - charged | D E |
| | | K R |
| AROMATIC | | H F W Y |

The present invention also encompasses homologous substitution (substitution and replacement are both used herein to mean the interchange of an existing amino acid residue, with an alternative residue) may occur i.e. like-for-like substitution such as basic for basic, acidic for acidic, polar for polar etc. Non-homologous substitution may also occur i.e. from one class of residue to another or alternatively involving the inclusion of unnatural amino acids such as ornithine (hereinafter referred to as Z), diaminobutyric acid ornithine (hereinafter referred to as B), norleucine ornithine (hereinafter referred to as O), pyriylalanine, thienylalanine, naphthylalanine and phenylglycine.

Replacements may also be made by unnatural amino acids include; alpha* and alpha-disubstituted* amino acids, N-alkyl amino acids*, lactic acid*, halide derivatives of natural amino acids such as trifluorotyrosine*, p-Cl-phenylalanine*, p-Br-phenylalanine*, p-I-phenylalanine*, L-allyl-glycine*, ß-alanine*, L-α-amino butyric acid*, L-γ-amino butyric acid*, L-α-amino isobutyric acid*, L-ε-amino caproic acid#, 7-amino heptanoic acid*, L-methionine sulfone#*, L-norleucine*, L-norvaline*, p-nitro-L-phenylalanine*, L-hydroxyproline#, L-thioproline*, methyl derivatives of phenylalanine (Phe) such as 4-methyl-Phe*, pentamethyl-Phe*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (methyl)*, L-Phe (4-isopropyl)*, L-Tic (1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxyl acid)*, L-diaminopropionic acid # and L-Phe (4-benzyl)*. The notation * has been utilised for the purpose of the discussion above (relating to homologous or non-homologous substitution), to indicate the hydrophobic nature of the derivative whereas # has been utilised to indicate the hydrophilic nature of the derivative, #* indicates amphipathic characteristics.

Variant amino acid sequences may include suitable spacer groups that may be inserted between any two amino acid residues of the sequence including alkyl groups such as methyl, ethyl or propyl groups in addition to amino acid spacers such as glycine or β-alanine residues. A further form of variation, involves the presence of one or more amino acid residues in peptoid form, will be well understood by those skilled in the art. For the avoidance of doubt, "the peptoid form" is used to refer to variant amino acid residues wherein the α-carbon substituent group is on the residue's nitrogen atom rather than the α-carbon. Processes for preparing peptides in the peptoid form are known in the art, for example Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 and Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

## HYBRIDISATION

The present invention also encompasses the use of sequences that can hybridise to the target sequences presented herein – such as if the agent is an anti-sense sequence.

The term "hybridization" as used herein shall include "the process by which a strand of nucleic acid joins with a complementary strand through base pairing" as well as the process of amplification as carried out in polymerase chain reaction (PCR) technologies.

Nucleotide sequences of the invention capable of selectively hybridising to the nucleotide sequences presented herein, or to their complement, will be generally at least 75%, preferably at least 85 or 90% and more preferably at least 95% or 98% homologous to the corresponding complementary nucleotide sequences presented herein over a region of at least 20, preferably at least 25 or 30, for instance at least 40, 60 or 100 or more contiguous nucleotides. Preferred nucleotide sequences of the invention will comprise regions homologous to the nucleotide sequence set out in SEQ ID No 2 of the sequence listings of the present invention preferably at least 80 or 90% and more preferably at least 95% homologous to the nucleotide sequence set out in SEQ ID No 2 of the sequence listings of the present invention.

The term "selectively hybridizable" means that the nucleotide sequence, when used as a probe, is used under conditions where a target nucleotide sequence of the invention is found to hybridize to the probe at a level significantly above background. The background hybridization may occur because of other nucleotide sequences present, for example, in the cDNA or genomic DNA library being screened. In this event, background implies a level of signal generated by interaction between the probe and a non-specific DNA member of the library which is less than 10 fold, preferably less than 100 fold as intense as the specific interaction observed with the target DNA. The intensity of interaction may be measured, for example, by radiolabelling the probe, e.g. with $^{32}$P.

Hybridization conditions are based on the melting temperature (Tm) of the nucleic acid binding complex, as taught in Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego CA), and confer a defined "stringency" as explained below.

Maximum stringency typically occurs at about Tm-5°C (5°C below the Tm of the probe); high stringency at about 5°C to 10°C below Tm; intermediate stringency at about 10°C to 20°C below Tm; and low stringency at about 20°C to 25°C below Tm.

As will be understood by those of skill in the art, a maximum stringency hybridization can be used to identify or detect identical nucleotide sequences while an intermediate (or low) stringency hybridization can be used to identify or detect similar or related polynucleotide sequences.

In a preferred aspect, the present invention covers nucleotide sequences that can hybridise to the nucleotide sequence of the present invention under stringent conditions (e.g. 65°C and 0.1xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M $Na_3$ Citrate pH 7.0). Where the nucleotide sequence of the invention is double-stranded, both strands of the duplex, either individually or in combination, are encompassed by the present invention. Where the nucleotide sequence is single-stranded, it is to be understood that the complementary sequence of that nucleotide sequence is also included within the scope of the present invention.

Nucleotide sequences which are not 100% homologous to the sequences of the present invention but fall within the scope of the invention can be obtained in a number of ways. Other variants of the sequences described herein may be obtained for example by probing DNA libraries made from a range of sources. In addition, other viral/bacterial, or cellular homologues particularly cellular homologues found in mammalian cells (e.g. rat, mouse, bovine and primate cells), may be obtained and such homologues and fragments thereof in general will be capable of selectively hybridising to the sequences shown in the sequence listing herein. Such sequences may be obtained by probing cDNA libraries made from or genomic DNA libraries from other animal species, and probing such libraries with probes comprising all or part of the nucleotide sequence set out in herein under conditions of medium to high stringency. Similar considerations apply to obtaining species homologues and allelic variants of the amino acid and/or nucleotide sequences of the present invention.

Variants and strain/species homologues may also be obtained using degenerate PCR which will use primers designed to target sequences within the variants and homologues encoding conserved amino acid sequences within the sequences of the present invention. Conserved sequences can be predicted, for example, by aligning the amino acid sequences from several variants/homologues. Sequence alignments can be performed using computer software known in the art. For example the GCG Wisconsin PileUp program is widely used. The primers used in degenerate PCR will contain one or more degenerate positions and will be used at stringency conditions

1518
1761

lower than those used for cloning sequences with single sequence primers against known sequences.

Alternatively, such nucleotide sequences may be obtained by site directed mutagenesis of characterised sequences, such as the nucleotide sequence set out in SEQ ID No 2 of the sequence listings of the present invention. This may be useful where for example silent codon changes are required to sequences to optimise codon preferences for a particular host cell in which the nucleotide sequences are being expressed. Other sequence changes may be desired in order to introduce restriction enzyme recognition sites, or to alter the activity of the protein encoded by the nucleotide sequences.

The nucleotide sequences of the present invention may be used to produce a primer, e.g. a PCR primer, a primer for an alternative amplification reaction, a probe e.g. labelled with a revealing label by conventional means using radioactive or non-radioactive labels, or the nucleotide sequences may be cloned into vectors. Such primers, probes and other fragments will be at least 15, preferably at least 20, for example at least 25, 30 or 40 nucleotides in length, and are also encompassed by the term nucleotide sequence of the invention as used herein.

The nucleotide sequences such as a DNA polynucleotides and probes according to the invention may be produced recombinantly, synthetically, or by any means available to those of skill in the art. They may also be cloned by standard techniques.

In general, primers will be produced by synthetic means, involving a step wise manufacture of the desired nucleic acid sequence one nucleotide at a time. Techniques for accomplishing this using automated techniques are readily available in the art.

Longer nucleotide sequences will generally be produced using recombinant means, for example using a PCR (polymerase chain reaction) cloning techniques. This will involve making a pair of primers (e.g. of about 15 to 30 nucleotides) flanking a region of the targeting sequence which it is desired to clone, bringing the primers into contact with mRNA or cDNA obtained from an animal or human cell, performing a polymerase chain reaction (PCR) under conditions which bring about amplification of the desired region, isolating the amplified fragment (e.g. by purifying the reaction mixture on an agarose gel) and recovering the amplified DNA. The primers may be designed to contain suitable restriction enzyme recognition sites so that the amplified DNA can be cloned into a suitable cloning vector.

Due to the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences which encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid sequence, may be used to clone and express the target sequences. As will be understood by those of skill in the art, for certain expression systems, it may be advantageous to produce the target sequences with non-naturally occurring codons. Codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host (Murray E *et al* (1989) Nuc Acids Res 17:477-508) can be selected, for example, to increase the rate of the target expression or to produce recombinant RNA transcripts having desirable properties, such as a longer half-life, than transcripts produced from naturally occurring sequence.

## EXPRESSION VECTORS

The nucleotide sequence for use as the target or for expressing the target can be incorporated into a recombinant replicable vector. The vector may be used to replicate and express the nucleotide sequence in and/or from a compatible host cell. Expression may be controlled using control sequences which include promoters/enhancers and other expression regulation signals. Prokaryotic promoters and promoters functional in eukaryotic cells may be used. Tissue specific or stimuli specific promoters may be used. Chimeric promoters may also be used comprising sequence elements from two or more different promoters described above.

The protein produced by a host recombinant cell by expression of the nucleotide sequence may be secreted or may be contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. The coding sequences can be designed with signal sequences which direct secretion of the substance coding sequences through a particular prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

## FUSION PROTEINS

The target amino acid sequence may be produced as a fusion protein, for example to aid in extraction and purification. Examples of fusion protein partners include glutathione-S-transferase (GST), 6xHis, GAL4 (DNA binding and/or transcriptional activation domains) and β-galactosidase. It may also be convenient to include a proteolytic cleavage site between the fusion protein partner and the protein sequence

of interest to allow removal of fusion protein sequences. Preferably the fusion protein will not hinder the activity of the target.

The fusion protein may comprise an antigen or an antigenic determinant fused to the substance of the present invention. In this embodiment, the fusion protein may be a non-naturally occurring fusion protein comprising a substance which may act as an adjuvant in the sense of providing a generalised stimulation of the immune system. The antigen or antigenic determinant may be attached to either the amino or carboxy terminus of the substance.

In another embodiment of the invention, the amino acid sequence may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, for screening of peptide libraries for agents capable of affecting the substance activity, it may be useful to encode a chimeric substance expressing a heterologous epitope that is recognized by a commercially available antibody.

## ANTIBODIES

In one embodiment of the present invention, the agent of the present invention may be an antibody. In addition, or in the alternative, the target of the present invention may be an antibody.

Antibodies may be produced by standard techniques, such as by immunisation with the substance of the invention or by using a phage display library.

For the purposes of this invention, the term "antibody", unless specified to the contrary, includes but is not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, fragments produced by a Fab expression library, as well as mimetics thereof. Such fragments include fragments of whole antibodies which retain their binding activity for a target substance, Fv, F(ab') and F(ab')$_2$ fragments, as well as single chain antibodies (scFv), fusion proteins and other synthetic proteins which comprise the antigen-binding site of the antibody. Furthermore, the antibodies and fragments thereof may be humanised antibodies. Neutralizing antibodies, i.e., those which inhibit biological activity of the substance polypeptides, are especially preferred for diagnostics and therapeutics.

If polyclonal antibodies are desired, a selected mammal (e.g., mouse, rabbit, goat, horse, etc.) is immunised with an immunogenic polypeptide bearing a epitope(s) obtainable from an identified agent and/or substance of the present invention. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminium hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are potentially useful human adjuvants which may be employed if purified the substance polypeptide is administered to immunologically compromised individuals for the purpose of stimulating systemic defence.

Serum from the immunised animal is collected and treated according to known procedures. If serum containing polyclonal antibodies to an epitope obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention contains antibodies to other antigens, the polyclonal antibodies can be purified by immunoaffinity chromatography. Techniques for producing and processing polyclonal antisera are known in the art. In order that such antibodies may be made, the invention also provides polypeptides of the invention or fragments thereof haptenised to another polypeptide for use as immunogens in animals or humans.

Monoclonal antibodies directed against epitopes obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention can also be readily produced by one skilled in the art. The general methodology for making monoclonal antibodies by hybridomas is well known. Immortal antibody-producing cell lines can be created by cell fusion, and also by other techniques such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. Panels of monoclonal antibodies produced against orbit epitopes can be screened for various properties; i.e., for isotype and epitope affinity.

Monoclonal antibodies to the substance and/or identified agent of the present invention may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique originally described by Koehler and Milstein (1975 Nature 256:495-497), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor *et al* (1983) Immunol Today 4:72; Cote *et al* (1983) Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030) and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al* (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer

Therapy, Alan R Liss Inc, pp 77-96). In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (Morrison *et al* (1984) Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855; Neuberger *et al* (1984) Nature 312:604-608; Takeda *et al* (1985) Nature 314:452-454). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (US Patent No. 4,946,779) can be adapted to produce the substance specific single chain antibodies.

Antibodies, both monoclonal and polyclonal, which are directed against epitopes obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention are particularly useful in diagnosis, and those which are neutralising are useful in passive immunotherapy. Monoclonal antibodies, in particular, may be used to raise anti-idiotype antibodies. Anti-idiotype antibodies are immunoglobulins which carry an "internal image" of the substance and/or agent against which protection is desired. Techniques for raising anti-idiotype antibodies are known in the art. These anti-idiotype antibodies may also be useful in therapy.

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in Orlandi *et al* (1989, Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837), and Winter G and Milstein C (1991; Nature 349:293-299).

Antibody fragments which contain specific binding sites for the substance may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, the $F(ab')_2$ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the $F(ab')_2$ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (Huse WD *et al* (1989) Science 256:1275-128 1).

## REPORTERS

A wide variety of reporters may be used in the assay methods (as well as screens) of the present invention with preferred reporters providing conveniently detectable signals (eg. by spectroscopy). By way of example, a reporter gene may encode an enzyme which catalyses a reaction which alters light absorption properties.

Examples of reporter molecules include but are not limited to β-galactosidase, invertase, green fluorescent protein, luciferase, chloramphenicol, acetyltransferase, β-glucuronidase, exo-glucanase and glucoamylase. Alternatively, radiolabelled or fluorescent tag-labelled nucleotides can be incorporated into nascent transcripts which are then identified when bound to oligonucleotide probes.

In one preferred embodiment, the production of the reporter molecule is measured by the enzymatic activity of the reporter gene product, such as β-galactosidase.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of the target, such as by using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the protein, are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA) and fluorescent activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilising monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on PDE polypeptides is preferred, but a competitive binding assay may be employed. These and other assays are described, among other places, in Hampton R *et al* (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul MN) and Maddox DE *et al* (1983, J Exp Med 15 8:121 1).

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic and amino acid assays. Means for producing labelled hybridisation or PCR probes for detecting the target polynucleotide sequences include oligolabelling, nick translation, end-labelling or PCR amplification using a labelled nucleotide. Alternatively, the PDE coding sequence, or any portion of it, may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3 or SP6 and labelled nucleotides.

A number of companies such as Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI), and US Biochemical Corp (Cleveland, OH) supply commercial kits and protocols for these procedures. Suitable reporter molecules or labels include those radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles and the like. Patents teaching the use of such labels include US-A-3817837; US-A-3850752; US-

A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 and US-A-4366241. Also, recombinant immunoglobulins may be produced as shown in US-A-4816567.

Additional methods to quantify the expression of a particular molecule include radiolabeling (Melby PC *et al* 1993 J Immunol Methods 159:235-44) or biotinylating (Duplaa C *et al* 1993 Anal Biochem 229-36) nucleotides, coamplification of a control nucleic acid, and standard curves onto which the experimental results are interpolated. Quantification of multiple samples may be speeded up by running the assay in an ELISA format where the oligomer of interest is presented in various dilutions and a spectrophotometric or calorimetric response gives rapid quantification.

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, its presence and expression should be confirmed. For example, if the nucleotide sequence is inserted within a marker gene sequence, recombinant cells containing the same may be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a target coding sequence under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the target as well.

Alternatively, host cells which contain the coding sequence for the target and express the target coding regions may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridisation and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane-based, solution-based, or chip-based technologies for the detection and/or quantification of the nucleic acid or protein.

## GENERAL ASSAYS FOR cAMP ACTIVITY/LEVELS

The ability of a test agent to potentiate cAMP may be determined by measuring a relevant increase or decrease of a target level. In addition, or in the alternative, the ability of a test agent to potentiate cAMP may be determined by measuring a relevant increase in cAMP levels. By way of example, one may adapt the teachings of Smith *et al* 1993 (Appl. Biochem. Biotechnol. 41:189-218). There are also commercially available immunoassay kits for the measurement of cAMP (eg Amersham International, Arlington Heights, IL and DuPont, Boston, MA). Details on a suitable cAMP assay are provided in the Experimental Section.

## SCREENS

Any one or more of appropriate targets - such as an amino acid sequence and/or nucleotide sequence - may be used for identifying a $P_{cAMP}$ in any of a variety of drug screening techniques. The target employed in such a test may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The target may even be within an animal model, wherein said target may be an exogenous target or an introduced target. The animal model will be a non-human animal model. The abolition of target activity or the formation of binding complexes between the target and the agent being tested may be measured.

Techniques for drug screening may be based on the method described in Geysen, European Patent Application 84/03564, published on September 13, 1984. In summary, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with a suitable target or fragment thereof and washed. Bound entities are then detected - such as by appropriately adapting methods well known in the art. A purified target can also be coated directly onto plates for use in a drug screening techniques. Alternatively, non-neutralising antibodies can be used to capture the peptide and immobilise it on a solid support.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralising antibodies capable of binding a target specifically compete with a test compound for binding to a target.

Another technique for screening provides for high throughput screening (HTS) of agents having suitable binding affinity to the substances and is based upon the method described in detail in WO 84/03564.

It is expected that the assay methods of the present invention will be suitable for both small and large-scale screening of test compounds as well as in quantitative assays.

Thus, the present invention also relates to a method of identifying agents that potentiate cAMP, the method comprising contacting a suitable target with the agent and then measuring the activity and/or levels of cAMP.

The present invention also relates to a method of identifying agents that selectively potentiate cAMP in female sexual genitalia, the method comprising contacting a suitable target from female sexual genitalia and then measuring the activity and/or levels of cAMP.

The present invention also relates to a method of identifying agents that potentiate cAMP, the method comprising contacting a suitable target with the agent and then measuring the activity and/or levels of the target.

The present invention also relates to a method of identifying agents that selectively potentiate cAMP in female sexual genitalia, the method comprising contacting a suitable target from female sexual genitalia and then measuring the activity and/or levels of the target.

In a preferred aspect, the screen of the present invention comprises at least the following steps (which need not be in this same consecutive order): (a) conducting an *in vitro* screen to determine whether a candidate agent has the relevant activity (such as modulation of PDEII and/or NEP, such as NEP from dog kidney); (b) conducting one or more selectivity screens to determine the selectivity of said candidate agent (e.g. to see if said agent is also an ACE inhibitor – such as by using the assay protocol presented herein); and (c) conducting an *in vivo* screen with said candidate agent (e.g. using a functional animal model). Typically, if said candidate agent passes screen (a) and screen (b) then screen (c) is performed.

## DIAGNOSTICS

The present invention also provides a diagnostic composition or kit for the detection of a pre-disposition for FSAD. In this respect, the composition or kit will comprise an entity that is capable of indicating the presence of one or more - or even the absence of one or more - of the targets in a test sample. Preferably, the test sample is obtained from the female sexual genitalia or a secretion thereof or therefrom.

By way of example, the diagnostic composition may comprise any one of the nucleotide sequences mentioned herein or a variant, homologue, fragment or derivative thereof, or a sequence capable of hybridising to all or part of any one of the nucleotide sequence.

In order to provide a basis for the diagnosis of disease, normal or standard values from a target should be established. This may be accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with an antibody to a target under conditions suitable for complex formation which are well known in the art. The amount of standard complex formation may be quantified by comparing it to a dilution series of positive controls where a known amount of antibody is combined with known concentrations of a purified target. Then, standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from subjects potentially affected by FSAD. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state.

A target itself, or any part thereof, may provide the basis for a diagnostic and/or a therapeutic compound. For diagnostic purposes, target polynucleotide sequences may be used to detect and quantify gene expression in conditions, disorders or diseases in which FSAD may be implicated.

The target encoding polynucleotide sequence may be used for the diagnosis of FSAD resulting from expression of the target. For example, polynucleotide sequences encoding a target may be used in hybridisation or PCR assays of tissues from biopsies or autopsies or biological fluids, to detect abnormalities in target expression. The form of such qualitative or quantitative methods may include Southern or northern analysis, dot blot or other membrane-based technologies; PCR technologies; dip stick, pin or chip technologies; and ELISA or other multiple sample formal technologies. All of these techniques are well known in the art and are in fact the basis of many commercially available diagnostic kits.

Such assays may be tailored to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regime and may be used in animal studies, in clinical trials, or in monitoring the treatment of an individual patient. In order to provide a basis for the diagnosis of disease, a normal or standard profile for target expression should be established. This is accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with the target or a portion thereof, under conditions suitable for hybridisation or amplification. Standard hybridisation may be quantified by comparing the values obtained for normal subjects with a dilution series of positive controls run in the same experiment where a known amount of purified target is used. Standard values obtained from normal samples may be compared

with values obtained from samples from subjects potentially affected by a disorder or disease related to expression of the target coding sequence. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state. If disease is established, an existing therapeutic agent is administered, and treatment profile or values may be generated. Finally, the assay may be repeated on a regular basis to evaluate whether the values progress toward or return to the normal or standard pattern. Successive treatment profiles may be used to show the efficacy of treatment over a period of several days or several months.

Thus, in one aspect, the present invention relates to the use of a target polypeptide, or variant, homologue, fragment or derivative thereof, to produce anti-target antibodies which can, for example, be used diagnostically to detect and quantify target levels in an FSAD states.

The present invention further provides diagnostic assays and kits for the detection of a target in cells and tissues comprising a purified target which may be used as a positive control, and anti-target antibodies. Such antibodies may be used in solution-based, membrane-based, or tissue-based technologies to detect any disease state or condition related to the expression of target protein or expression of deletions or a variant, homologue, fragment or derivative thereof.

## ASSAY METHODS

The diagnostic compositions and/or methods and/or kits may be used in the following techniques which include but are not limited to; competitive and non-competitive assays, radioimmunoassay, bioluminescence and chemiluminescence assays, fluorometric assays, sandwich assays, immunoradiometric assays, dot blots, enzyme linked assays including ELISA, microtiter plates, antibody coated strips or dipsticks for rapid monitoring of urine or blood, immunohistochemistry and immunocytochemistry.

By way of example, an immunohistochemistry kit may also be used for localization of NEP, PDE or NPY activity in genital tissue. This immunohistochemistry kit permits localization of NEP, PDE or NPY in tissue sections and cultured cells using both light and electron microscopy which may be used for both research and clinical purposes. Such information may be useful for diagnostic and possibly therapeutic purposes in the detection and/or prevention and/or treatment of a FSD, such as FSAD. For each kit the range, sensitivity, precision, reliability, specificity and reproducibility of the assay are established. Intraassay and interassay variation is established at 20%, 50% and 80% points on the standard curves of displacement or activity.

## PROBES

Another aspect of the subject invention is the provision of nucleic acid hybridisation or PCR probes which are capable of detecting (especially those that are capable of selectively selecting) polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding a target coding region or closely related molecules, such as alleles. The specificity of the probe, i.e., whether it is derived from a highly conserved, conserved or non-conserved region or domain, and the stringency of the hybridisation or amplification (high, intermediate or low) will determine whether the probe identifies only naturally occurring target coding sequence, or related sequences. Probes for the detection of related nucleic acid sequences are selected from conserved or highly conserved nucleotide regions of target family members and such probes may be used in a pool of degenerate probes. For the detection of identical nucleic acid sequences, or where maximum specificity is desired, nucleic acid probes are selected from the non-conserved nucleotide regions or unique regions of the target polynucleotides. As used herein, the term "non-conserved nucleotide region" refers to a nucleotide region that is unique to a target coding sequence disclosed herein and does not occur in related family members.

PCR as described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188 provides additional uses for oligonucleotides based upon target sequences. Such oligomers are generally chemically synthesized, but they may be generated enzymatically or produced from a recombinant source. Oligomers generally comprise two nucleotide sequences, one with sense orientation (5'->3') and one with antisense (3'<-5') employed under optimised conditions for identification of a specific gene or condition. The same two oligomers, nested sets of oligomers, or even a degenerate pool of oligomers may be employed under less stringent conditions for detection and/or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

The nucleic acid sequence for a target can also be used to generate hybridisation probes as previously described, for mapping the endogenous genomic sequence. The sequence may be mapped to a particular chromosome or to a specific region of the chromosome using well known techniques. These include *in situ* hybridisation to chromosomal spreads (Verma *et al* (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York City), flow-sorted chromosomal preparations, or artificial chromosome constructions such as YACs, bacterial artificial chromosomes (BACs), bacterial PI constructions or single chromosome cDNA libraries.

*In situ* hybridisation of chromosomal preparations and physical mapping techniques such as linkage analysis using established chromosomal markers are invaluable in extending genetic maps. Examples of genetic maps can be found in Science (1995; 270:410f and 1994; 265:1981f). Often the placement of a gene on the chromosome of another mammalian species may reveal associated markers even if the number or arm of a particular human chromosome is not known. New sequences can be assigned to chromosomal arms, or parts thereof, by physical mapping. This provides valuable information to investigators searching for disease genes using positional cloning or other gene discovery techniques. Once a disease or syndrome has been crudely localised by genetic linkage to a particular genomic region any sequences mapping to that area may represent associated or regulatory genes for further investigation. The nucleotide sequence of the subject invention may also be used to detect differences in the chromosomal location due to translocation, inversion, etc. between normal, carrier or affected individuals.

HOST CELLS

The term "host cell" - in relation to the present invention includes any cell that could comprise the target for the agent of the present invention.

Thus, a further embodiment of the present invention provides host cells transformed or transfected with a polynucleotide that is or expresses the target of the present invention. Preferably said polynucleotide is carried in a vector for the replication and expression of polynucleotides that are to be the target or are to express the target. The cells will be chosen to be compatible with the said vector and may for example be prokaryotic (for example bacterial), fungal, yeast or plant cells.

The gram-negative bacterium *E. coli* is widely used as a host for heterologous gene expression. However, large amounts of heterologous protein tend to accumulate inside the cell. Subsequent purification of the desired protein from the bulk of *E.coli* intracellular proteins can sometimes be difficult.

In contrast to *E.coli*, bacteria from the genus *Bacillus* are very suitable as heterologous hosts because of their capability to secrete proteins into the culture medium. Other bacteria suitable as hosts are those from the genera *Streptomyces* and *Pseudomonas*.

Depending on the nature of the polynucleotide encoding the polypeptide of the present invention, and/or the desirability for further processing of the expressed protein, eukaryotic hosts such as yeasts or other fungi may be preferred. In general, yeast cells are preferred over fungal cells because they are easier to manipulate. However, some proteins are either poorly secreted from the yeast cell, or in some cases are not processed properly (e.g. hyperglycosylation in yeast). In these instances, a different fungal host organism should be selected.

Examples of suitable expression hosts within the scope of the present invention are fungi such as *Aspergillus* species (such as those described in EP-A-0184438 and EP-A-0284603) and *Trichoderma* species; bacteria such as *Bacillus* species (such as those described in EP-A-0134048 and EP-A-0253455), *Streptomyces* species and *Pseudomonas* species; and yeasts such as *Kluyveromyces* species (such as those described in EP-A-0096430 and EP-A-0301670) and *Saccharomyces* species. By way of example, typical expression hosts may be selected from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger var. tubigenis*, *Aspergillus niger var. awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus orvzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*.

The use of suitable host cells - such as yeast, fungal and plant host cells - may provide for post-translational modifications (e.g. myristoylation, glycosylation, truncation, lapidation and tyrosine, serine or threonine phosphorylation) as may be needed to confer optimal biological activity on recombinant expression products of the present invention.

ORGANISM

The term "organism" in relation to the present invention includes any organism that could comprise the target according to the present invention and/or products obtained therefrom. Examples of organisms may include a fungus, yeast or a plant.

The term "transgenic organism" in relation to the present invention includes any organism that comprises the target according to the present invention and/or products obtained.

TRANSFORMATION OF HOST CELLS/HOST ORGANISMS

As indicated earlier, the host organism can be a prokaryotic or a eukaryotic organism. Examples of suitable prokaryotic hosts include *E. coli* and *Bacillus subtilis*. Teachings on the transformation of prokaryotic hosts is well documented in the art, for example see Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) and Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

If a prokaryotic host is used then the nucleotide sequence may need to be suitably modified before transformation - such as by removal of introns.

In another embodiment the transgenic organism can be a yeast. In this regard, yeast have also been widely used as a vehicle for heterologous gene expression. The species *Saccharomyces cerevisiae* has a long history of industrial use, including its use for heterologous gene expression. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* has been reviewed by Goodey et al (1987, Yeast Biotechnology, D R Berry et al, eds, pp 401-429, Allen and Unwin, London) and by King et al (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E F Walton and G T Yarronton, eds, pp 107-133, Blackie, Glasgow).

For several reasons *Saccharomyces cerevisiae* is well suited for heterologous gene expression. First, it is non-pathogenic to humans and it is incapable of producing certain endotoxins. Second, it has a long history of safe use following centuries of commercial exploitation for various purposes. This has led to wide public acceptability. Third, the extensive commercial use and research devoted to the organism has resulted in a wealth of knowledge about the genetics and physiology as well as large-scale fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*.

A review of the principles of heterologous gene expression in Saccharomyces cerevisiae and secretion of gene products is given by E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", Yeasts, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.).

Several types of yeast vectors are available, including integrative vectors, which require recombination with the host genome for their maintenance, and autonomously replicating plasmid vectors.

In order to prepare the transgenic Saccharomyces, expression constructs are prepared by inserting the nucleotide sequence of the present invention into a construct designed for expression in yeast. Several types of constructs used for heterologous expression have been developed. The constructs contain a promoter active in yeast fused to the nucleotide sequence of the present invention, usually a promoter of yeast origin, such as the GAL1 promoter, is used. Usually a signal sequence of yeast origin, such as the sequence encoding the SUC2 signal peptide, is used. A terminator active in yeast ends the expression system.

For the transformation of yeast several transformation protocols have been developed. For example, a transgenic Saccharomyces according to the present invention can be prepared by following the teachings of Hinnen et al (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929); Beggs, J D (1978, Nature, London, 275, 104); and Ito, H et al (1983, J Bacteriology 153, 163-168).

The transformed yeast cells are selected using various selective markers. Among the markers used for transformation are a number of auxotrophic markers such as LEU2, HIS4 and TRP1, and dominant antibiotic resistance markers such as aminoglycoside antibiotic markers, eg G418.

Another host organism is a plant. The basic principle in the construction of genetically modified plants is to insert genetic information in the plant genome so as to obtain a stable maintenance of the inserted genetic material. Several techniques exist for inserting the genetic information, the two main principles being direct introduction of the genetic information and introduction of the genetic information by use of a vector system. A review of the general techniques may be found in articles by Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) and Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994 17-27). Further teachings on plant transformation may be found in EP-A-0449375.

Thus, the present invention also provides a method of transforming a host cell with a nucleotide sequence that is to be the target or is to express the target. Host cells transformed with the nucleotide sequence may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the encoded protein from cell culture. The protein produced by a recombinant cell may be secreted or may be contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing coding sequences can be designed with signal sequences which direct secretion of the coding sequences through a particular prokaryotic or eukaryotic cell membrane. Other recombinant constructions may join the coding sequence to nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins (Kroll *DJ et al* (1993) DNA Cell Biol 12:441-53).

## PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising administering a therapeutically effective amount of the agent of the present invention and a. pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipients (including combinations thereof).

The pharmaceutical compositions may be for human or animal usage in human and veterinary medicine and will typically comprise any one or more of a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, or excipient. Acceptable carriers or diluents for therapeutic use are well known in the pharmaceutical art, and are described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). The choice of pharmaceutical carrier, excipient or diluent can be selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice. The pharmaceutical compositions may comprise as - or in addition to - the carrier, excipient or diluent any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s), solubilising agent(s).

Preservatives, stabilizers, dyes and even flavoring agents may be provided in the pharmaceutical composition. Examples of preservatives include sodium benzoate, sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid. Antioxidants and suspending agents may be also used.

There may be different composition/formulation requirements dependent on the different delivery systems. By way of example, the pharmaceutical composition of the present invention may be formulated to be delivered using a mini-pump or by a mucosal route, for example, as a nasal spray or aerosol for inhalation or ingestable solution, or parenterally in which the composition is formulated by an injectable form, for delivery, by, for example, an intravenous, intramuscular or subcutaneous route. Alternatively, the formulation may be designed to be delivered by both routes.

Where the agent is to be delivered mucosally through the gastrointestinal mucosa, it should be able to remain stable during transit though the gastrointestinal tract; for example, it should be resistant to proteolytic degradation, stable at acid pH and resistant to the detergent effects of bile.

Where appropriate, the pharmaceutical compositions can be administered by inhalation, in the form of a suppository or pessary, topically in the form of a lotion, solution, cream, ointment or dusting powder, by use of a skin patch, orally in the form of tablets containing excipients such as starch or lactose, or in capsules or ovules either alone or in admixture with excipients, or in the form of elixirs, solutions or suspensions containing flavouring or colouring agents, or they can be injected parenterally, for example intravenously, intramuscularly or subcutaneously. For parenteral administration, the compositions may be best used in the form of a sterile aqueous solution which may contain other substances, for example enough salts or monosaccharides to make the solution isotonic with blood. For buccal or sublingual administration the compositions may be administered in the form of tablets or lozenges which can be formulated in a conventional manner.

Preferably, the agent is in a form that is suitable for oral delivery.

For some embodiments, preferably the agent - when in use - does not act on the central nervous system.

For some embodiments, preferably the agent - when in use - is peripherally acting.

## ADMINISTRATION

The term "administered" includes delivery by viral or non-viral techniques. Viral delivery mechanisms include but are not limited to adenoviral vectors, adeno-associated viral (AAV) vectos, herpes viral vectors, retroviral vectors, lentiviral vectors, and baculoviral vectors. Non-viral delivery mechanisms include lipid mediated transfection, liposomes, immunoliposomes, lipofectin, cationic facial amphiphiles (CFAs) and combinations thereof.

The agents of the present invention may be administered alone but will generally be administered as a pharmaceutical composition – e.g. when the agent is in admixture with a suitable pharmaceutical excipient, diluent or carrier selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice.

For example, the agent can be administered (e.g. orally or topically) in the form of tablets, capsules, ovules, elixirs, solutions or suspensions, which may contain flavouring or colouring agents, for immediate-, delayed-, modified-, sustained-, pulsed- or controlled-release applications.

The tablets may contain excipients such as microcrystalline cellulose, lactose, sodium citrate, calcium carbonate, dibasic calcium phosphate and glycine, disintegrants such as starch (preferably corn, potato or tapioca starch), sodium starch glycollate, croscarmellose sodium and certain complex silicates, and granulation binders such as polyvinylpyrrolidone, hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), hydroxypropylcellulose (HPC), sucrose, gelatin and acacia. Additionally, lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, glyceryl behenate and talc may be included.

Solid compositions of a similar type may also be employed as fillers in gelatin capsules. Preferred excipients in this regard include lactose, starch, a cellulose, milk sugar or high molecular weight polyethylene glycols. For aqueous suspensions and/or elixirs, the agent may be combined with various sweetening or flavouring agents, colouring matter or dyes, with emulsifying and/or suspending agents and with diluents such as water, ethanol, propylene glycol and glycerin, and combinations thereof.

The routes for administration (delivery) include, but are not limited to, one or more of:

oral (e.g. as a tablet, capsule, or as an ingestable solution)
topical
mucosal (e.g. as a nasal spray or aerosol for inhalation)
nasal
parenteral (e.g. by an injectable form)
gastrointestinal
intraspinal
intraperitoneal
intramuscular
intravenous
intrauterine
intraocular
intradermal
intracranial
intratracheal
intravaginal
intracerebroventricular
intracerebral
subcutaneous
ophthalmic (including intravitreal or intracameral)
transdermal
rectal
buccal
vaginal
epidural
sublingual

It is to be understood that not all of the agent need be administered by the same route. Likewise, if the composition comprises more than one active component, then those components may be administered by different routes.

If the agent of the present invention is administered parenterally, then examples of such administration include one or more of: intravenously, intra-arterially, intraperitoneally, intrathecally, intraventricularly, intraurethrally, intrasternally, intracranially, intramuscularly or subcutaneously administering the agent; and/or by using infusion techniques.

For parenteral administration, the agent is best used in the form of a sterile aqueous solution which may contain other substances, for example, enough salts or glucose to make the solution isotonic with blood. The aqueous solutions should be suitably buffered (preferably to a pH of from 3 to 9), if necessary. The preparation of suitable parenteral formulations under sterile conditions is readily accomplished by standard pharmaceutical techniques well-known to those skilled in the art.

As indicated, the agent of the present invention can be administered intranasally or by inhalation and is conveniently delivered in the form of a dry powder inhaler or an aerosol spray presentation from a pressurised container, pump, spray or nebuliser with the use of a suitable propellant, e.g. dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, a hydrofluoroalkane such as 1,1,1,2-tetrafluoroethane (HFA 134A™) or 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropane (HFA 227EA™), carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurised aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. The pressurised container, pump, spray or nebuliser may contain a solution or suspension of the active compound, e.g. using a mixture of ethanol and the propellant as the solvent, which may additionally contain a lubricant, e.g. sorbitan trioleate. Capsules and cartridges (made, for example, from gelatin) for use in an inhaler or insufflator may be formulated to contain a powder mix of the agent and a suitable powder base such as lactose or starch.

Alternatively, the agent of the present invention can be administered in the form of a suppository or pessary, or it may be applied topically in the form of a gel, hydrogel, lotion, solution, cream, ointment or dusting powder. The agent of the present invention may also be dermally or transdermally administered, for example, by the use of a skin patch. They may also be administered by the pulmonary or rectal routes. They may also be administered by the ocular route. For ophthalmic use, the compounds can be formulated as micronised suspensions in isotonic, pH adjusted, sterile saline, or, preferably, as solutions in isotonic, pH adjusted, sterile saline, optionally in combination with a preservative such as a benzylalkonium chloride. Alternatively, they may be formulated in an ointment such as petrolatum.

For application topically to the skin, the agent of the present invention can be formulated as a suitable ointment containing the active compound suspended or dissolved in, for example, a mixture with one or more of the following: mineral oil, liquid petrolatum, white petrolatum, propylene glycol, polyoxyethylene polyoxypropylene compound, emulsifying wax and water. Alternatively, it can be formulated as a suitable lotion or cream, suspended or dissolved in, for example, a mixture of one or more of the following: mineral oil, sorbitan monostearate, a polyethylene glycol, liquid paraffin, polysorbate 60, cetyl esters wax, cetearyl alcohol, 2-octyldodecanol, benzyl alcohol and water.

The compositions of the present invention may be administered by direct injection.

For some applications, preferably the agent is administered orally.

For some applications, preferably the agent is administered topically.

## DOSE LEVELS

Typically, a physician will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual subject. The specific dose level and frequency of dosage for any particular patient may be varied and will depend upon a variety of factors including the activity of the specific compound employed, the metabolic stability and length of action of that compound, the age, body weight, general health, sex, diet, mode and time of administration, rate of excretion, drug combination, the severity of the particular condition, and the individual undergoing therapy. The agent and/or the pharmaceutical composition of the present invention may be administered in accordance with a regimen of from 1 to 10 times per day, such as once or twice per day.

For oral and parenteral administration to human patients, the daily dosage level of the agent may be in single or divided doses.

Depending upon the need, the agent may be administered at a dose of from 0.01 to 30 mg/kg body weight, such as from 0.1 to 10 mg/kg, more preferably from 0.1 to 1 mg/kg body weight. Naturally, the dosages mentioned herein are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited.

## ANIMAL TEST MODELS

*In vivo* models may be used to investigate and/or design therapies or therapeutic agents to treat FSAD. The models could be used to investigate the effect of various tools/lead compounds on a variety of paramaters which indicate the sexual arousal response. These animal test models can be used as, or in, the assay of the present invention. The animal test model will be a non-human animal test model.

There are a number of animal models for vasculogenic female sexual dysfunction (FSAD) available that could be used.

By way of example, reference may be made to invasive animal models (e.g. see Park *et al.*, 1997). Here, vaginal and clitoral haemodynamic responses can be directly recorded following pelvic nerve stimulation in normal and atherosclerotic female rabbits (a validated model of FSAD). The *in vivo* effects of cAMP potentiators - such as vasodilatory agents such as NPY antagonist or VIP agonists - can be investigated either in normal or FSAD animals.

By way of further example, reference may be made to non-invasive animal models (e.g. see the review of Goldstein *et al.*, 1998; Laan *et al.*, 1998). Here, pulsed wave Doppler ultrasonography provides a means of detecting blood flow changes in the vaginal and clitoral arteries. This model can be used to investigate vasculogenic effects during pharmacological administration of vasodilators.

Other non-invasive techniques that can be used include vaginal photoplethysmography, which provides a quantitative measure of vaginal mucosa engorgement, and vaginal thermal clearance techniques, which are based on the principle that vaginal blood flow changes can be recorded by measuring the heat transfer away from an intravaginal probe kept at a constant temperature.

In a preferred aspect, a non-invasive model of FSAD is used.

## AN ANIMAL MODEL OF SEXUAL AROUSAL

In our studies we have developed a robust reproducible model of the physiology of sexual arousal. This model uses an anaesthetised rabbit and employs Laser Doppler technologies to monitor genital blood flow whilst routinely recording cardiovascular parameters. We are capable of measuring small changes in vaginal (and even clitoral) blood flow induced by pelvic nerve stimulation or infusion of VIP in the absence and presence of test agents.

We believe that our animal model directly reflects the clinical data. Hence, this model can be used to study candidate agents for the treatment of FSAD, such as measuring enhancement of vaginal or clitoral blood flow.

## PHYSIOLOGICAL MEASUREMENT OF FEMALE SEXUAL AROUSAL

In accordance with the present invention, a number of different techniques may be used for measuring clitoral and vaginal blood flow. By way of example, use may be made of vaginal photoplethysmography, vaginal heat washout technique, clitoral and vaginal contrast-enhanced MRI, clitoral/vulval laser Doppler pulsed imaging, and clitoral ultrasonography.

Quantification of vaginal lubrication may also be measured by techniques known in the art - such as (a) pre- and post-stimulation weighing of vaginal tampons, and (b) measuring the pH of vaginal fluid. With respect to the latter aspect, the normal resting acid medium in the vagina becomes more alkaline as it approaches blood pH when transudation of fluid occurs during sexual stimulation.

## PDE (phosphodiesterase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is a PDE (phosphodiesterase).

It is known that cyclic nucleotides, such as cAMP and cGMP, are important intracellular second messengers. Cyclic nucleotide phosphodiesterases - otherwise known as PDEs - are a family of enzymes that catalyse the degradation of cyclic nucleotides and, in doing so, are one of the cellular components that regulate the concentration of cyclic nucleotides.

In recent years, at least seven PDE enzymes (such as PDEI - PDEVII), as well as many subtypes of these enzymes, have been defined based on substrate affinity and cofactor requirements (Beavo JA and Reifsnyder DH, Trends Pharmacol. Sci. 11:150 [1990]; Beavo J, In: Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action., Beavo J and Housley MD (Eds.). Wiley:Chichester, pp. 3-15 [1990]).

Examples of PDEs include: PDEI which is a $Ca^{2+}$/Calmodulin-dependent PDE; PDEII which is a cAMP and cGMP stimulated PDE; PDEIII which is a cGMP inhibited PDE; PDEIV which is a high affinity cAMP-specific PDE; and PDEV which is a cGMP specific PDE. PDEI etc. are sometimes called PDE type I etc. or PDE type 1 etc.

Each PDE family may contain two or more isoforms (i.e. there may be two or more PDE isoenzymes). By way of example, mammalian PDE IV, the homologue of the *Drosophila* Dunce gene (Chen CN *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 83:9313 [1986]), is known to have four isoforms in the rat (Swinnen JV *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 86:5325 [1989]). Human PDEs are also known to occur as isoforms and have splice variants. For example, the cloning of one human isoform of PDEIV from monocytes was reported in 1990 (Livi GP *et al.*, Mol. Cell. Bio., 10:2678 [1990]). By way of further example, other workers have independently cloned three splice variants of PDEIV, which are now designated hPDEIV-B1, hPDEIV-B2, and hPDEIV-B3.

Teachings on cyclic nucleotide phosphodiesterases can also be found in US-A-5932423 and US-A-5932465.

Teachings on a further cyclic nucleotide phosphodiesterase - namely CN PCDE8 - can be found in WO-A-97/35989. According to WO-A-97/35989, CN PCDE8 has two isozymes - which were designated CN PCDE8A and CN PCDE8B. The term "isozyme" is sometimes referred to in the art as "isoform".

According to WO-A-97/35989, many inhibitors of different PDEs have been identified and some have undergone clinical evaluation. For example, PDEIII inhibitors are being developed as antithrombotic agents, as antihypertensive agents and as cardiotonic agents useful in the treatment of congestive heart failure. Rolipram, a PDEIII inhibitor, has been used in the treatment of depression and other inhibitors of

PDEIII are undergoing evaluation as anti-inflammatory agents. Rolipram has also been shown to inhibit lipopolysaccharide (LPS) induced TNF-alpha which has been shown to enhance HIV-1 replication *in vitro*. Therefore, rolipram may inhibit HIV-1 replication (Angel *et al* 1995 AIDS 9:1137-44). Additionally, based on its ability to suppress the production of TNF alpha and beta and interferon gamma, rolipram has been shown to be effective in the treatment of encephalomyelitis, the experimental animal model for multiple sclerosis (Sommer *et al*, 1995 Nat Med 1:244-248) and may be effective in the treatment of tardive dyskinesia (Sasaki *et al*, 1995 Eur J Phamacol 282:71-76).

According to WO-A-97/35989, there are also non-specific PDE inhibitors such as theophylline, used in the treatment of bronchial asthma and other respiratory diseases, and pentoxifylline, used in the treatment of intermittent claudication and diabetes-induced peripheral vascular disease. Theophylline is thought to act on airway smooth muscle function as well as in an anti-inflammatory or immunomodulatory capacity in the treatment of respiratory diseases (Banner *et al* 1995 Respir J 8:996-1000) where it is thought to act by inhibiting both CN PDE cAMP and cGMP hydrolysis (Banner *et al* 1995 Monaldi Arch Chest Dis 50:286-292). Pentoxifylline, also known to block TNF-alpha production, may inhibit HIV-1 replication (Angel *et al supra*). A list of CN PDE inhibitors is given in Beavo 1995 *supra*.

It has been suggested that selective inhibitors of PDEs, in addition to their isozymes and their subtypes, will lead to more effective therapy with fewer side effects. For example, see the teachings in the reviews of Wieshaar RE *et al*, (J. Med. Chem., 28:537 [1985]), Giembycz MA (Biochem. Pharm., 43:2041 [1992]) and Lowe JA and Cheng JB (Drugs of the Future, 17:799-807 [1992]).

Thus, for some applications it is desirable to have a selective inhibition of an individual type of PDE.

Background teachings on PDEs have been presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning PDE2 or cGMP-stimulated PDE, has been extracted from that source.

> "Cyclic nucleotides serve as second messengers that mediate a variety of cellular responses to extracellular signals such as hormones, light, and neurotransmitters. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) play a role in signal transduction by regulating the cellular concentrations of cyclic nucleotides. Mammalian cells contain multiple PDEs that are distinguished into at least 7 families based on their substrate affinity and on their selective sensitivity to cofactors and inhibitory drugs. These families are: (I) Ca(2+)/calmodulin-dependent PDEs; (II) cGMP-stimulated PDEs; (III) cGMP-inhibited PDEs; (IV) cAMP-specific PDEs; (V) cGMP-specific PDEs; (VI) photoreceptor PDEs; and (VII) high-affinity, cAMP-specific. From the amino acid sequences, it is evident that all these PDE families contain a related domain, thought to be the catalytic domain, with approximately 30% sequence identity between families. Members of the same family are more closely related; they share 60 to 80% sequence identity throughout the entire coding region.
>
> Michaeli et al. (1993) established a highly sensitive functional screen for the isolation of cDNAs encoding cAMP phosphodiesterases by complementation of defects in the Saccharomyces cerevisiae strain lacking both endogenous cAMP PDE genes, PDE1 and PDE2. Three groups of cDNAs corresponding to 3 distinct human genes encoding cAMP-specific PDEs were isolated from a human glioblastoma cDNA library using this functional screen. Two of the genes were closely related to the Drosophila 'dunce' cAMP-specific PDE. The third gene, which Michaeli et al. (1993) referred to as HCP1, encoded a novel cAMP-specific PDE. HCP1 had an amino acid sequence related to the sequences of the catalytic domains of all cyclic nucleotide PDEs. It is a high-affinity cAMP-specific PDE that does not share other properties of the cAMP-specific PDE family, however. The PDE activity of HCP1 was not sensitive to cGMP or other inhibitors of the cGMP-inhibitable PDEs. The biochemical and pharmacologic properties of HCP1 suggested to Michaeli et al. (1993) that it is a member of a previously undiscovered cyclic nucleotide PDE family, which they designated as family VII. Northern blot analysis indicated the presence of high levels of an HCP1 RNA in human skeletal muscle.
>
> By Southern blot analysis of somatic cell hybrid lines, Milatovich et al. (1994) mapped the HCP1 locus to chromosome 8; by study of somatic cell hybrid lines that contained different regions of chromosome 8, they regionalized the assignment to 8q13-q22. Han et al. (1998) mapped the PDE7A gene to 8q13 by fluorescence in situ hybridization. By interspecific backcross analysis, they mapped the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3."

Background teachings on PDE2 have been presented by Jennifer P. Macke et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning PDE2 cGMP-stimulated has been extracted from that source.

> "Rosman et al. (1997) cloned a cDNA corresponding to human PDE2A. The PDE2A gene encodes a 941 amino acid polypeptide with a predicted molecular mass of 106 kD. The protein sequence is 90% identical to bovine and rat PDE2A sequences. Northern blot analysis showed that PDE2A was expressed as a 4.2-kb mRNA at varying levels in all human tissues tested, with greatest expression in brain. Expression studies revealed that PDE2A hydrolyzes cAMP and cGMP and is inhibited by the PDE2A-specific inhibitor EHNA."

Nucleotide sequences and amino acid sequences for PDEs are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

In one aspect, the PDE target is selected from any one or more of the following PDE enzymes: $PDE_{cAMP}$ 1, $PDE_{cAMP}$ 2, $PDE_{cAMP}$ 3, $PDE_{cAMP}$ 4, $PDE_{cAMP}$ 7 and $PDE_{cAMP}$ 8.

In a more preferred aspect, the PDE target is selected from any one or more of the following PDE enzymes: $PDE_{cAMP}$ 1, $PDE_{cAMP}$ 2, $PDE_{cAMP}$ 3, and $PDE_{cAMP}$ 4.

Preferably, for the present invention, the PDE to target is at least PDE 2.

## I:PDE

As indicated above, the agent may be any suitable agent that can act as an I:PDE.

Broad aspects of this aspect of the present invention therefore relate to:

a) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD (preferably FSAD); the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

b) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD (preferably FSAD); wherein said agent is an I:PDE.

c) A method of treating a female suffering from FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

d) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

e) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is an I:PDE.

f) A method of treating a female for FSD (preferably FSAD) or to prevent FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an I:PDE.

Other aspects of the present invention encompass:

A) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

B) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD, and wherein said agent is an I:PDE.

C) A method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

D) An assay method for identifying an agent that can be used to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: determining whether an agent can directly or indirectly potentiate cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD; and wherein said agent is an I:PDE.

E) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

F) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; and wherein said agent is an I:PDE.

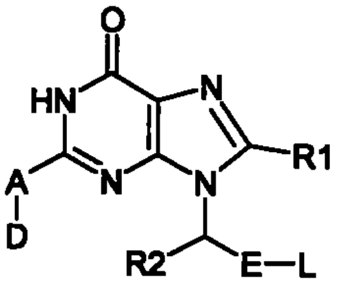
G) A method of treating a female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the female so as to cause enhanced genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; and wherein said agent is an I:PDE.

Examples of I:PDE are disclosed in EP-A-091133 and EP-A-0771799.

Preferably, the I:PDE is an I:PDE2. Thus, preferred example compounds are those presented in EP-A-0771799.

For convenience, claim 1 of EP-A-0771799 is now repeated:

A purin-6-one derivative with general formula (I):



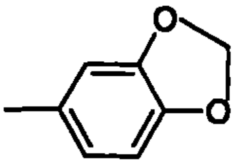
wherein:

| | |
|---|---|
| $R^1$ | represents hydrogen or a linear or branched alkyl containing up to 8 carbon atoms; |
| $R^2$ | represents a linear or branched acyl containing up to 4 carbon atoms, or a linear or branched alkyl containing up to 8 carbon atoms optionally substituted by hydroxyl, azido or a group with formula $-NR^3R^4$ or $-OSO_2R^5$; wherein |
| $R^3$ and $R^4$ | are identical or different and represent a cycloalkyl containing 3 to 6 carbon atoms, hydrogen, formyl, or a linear or branched alkyl containing up to 6 carbon atoms, optionally substituted by a linear or branched alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 6 carbon atoms or by a group with formula $-(CO)_a-NR^6R^7$, wherein |
| a | is the number 0 or 1; |
| $R^6$ and $R^7$ | are identical or different and represent hydrogen, formyl, hydroxyl, phenyl or a linear or branched alkyl containing up to 6 carbon atoms, optionally substituted by hydroxyl or a linear or branched alkoxy containing up to 5 carbon atoms; or |
| $R^3$ and/or $R^4$ | represent a linear or branched alkoxycarbonyl containing up to 6 carbon atoms, carboxyl or a linear or branched acyl containing up to 6 carbon atoms optionally substituted by hydroxyl or a linear or branched alkoxy containing up to 4 carbon atoms; or |
| $R^3$ and/or $R^4$ | represent a residue with formula $-(CO)_b-T-NR^8R^9$, $-CO-R^{10}$, $-SO_2R^{11}$ or $-SO_2NR^{12}R^{13}$, wherein |

| | |
|---|---|
| b | has the meaning given above for a and is identical thereto or different therefrom; |
| T | can represent a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms, or when b $\neq 0$ it can also represent a bond; |
| $R^8$ and $R^9$ | have the meaning given for $R^6$ and $R^7$ above and are identical thereto or different therefrom; |
| $R^{10}$ | represents a saturated, partially unsaturated or unsaturated 5- to 7-membered heterocycle containing up to 3 heteroatoms selected from S, N and/or O, which can optionally also be substituted on the N function by a linear or branched alkyl, alkoxy or alkoxycarbonyl containing up to 4 carbon atoms, carboxyl, benzyloxycarbonyl or hydroxyl; |
| $R^{11}$ | represents a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms, benzyl or phenyl; |
| $R^{12}$ and $R^{13}$ | are identical or different and represent hydrogen, phenyl or a linear or branched alkyl containing up to 6 carbon atoms;<br>or |
| $R^3$ and $R^4$ | together with the nitrogen atom form a 5- or 6-membered saturated, partially unsaturated or unsaturated heterocycle which can contain up to 3 heteroatoms selected from N, S and/or O or a $-NR^{14}$ residue, and which is optionally substituted by carbonyl, a linear or branched alkoxycarbonyl containing up to 5 carbon atoms or a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms which in its turn can be substituted by hydroxyl, carboxy or a linear or branched acyl, alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 6 carbon atoms; wherein |
| $R^{14}$ | represents hydrogen, carbonyl or a linear or branched alkyl or alkoxycarbonyl respectively containing up to 5 carbon atoms; and |
| $R^5$ | represents phenyl or a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms; |
| A | represents a linear or branched alkylene or alkenylene chain respectively containing up to 6 carbon atoms; |

| | |
|---|---|
| D and L | are identical or different and represent an aryl containing 6 to 10 carbon atoms or a 5- to 7-membered aromatic, optionally benzocondensed heterocycle containing up to 3 heteroatoms selected from S, N and/or O, optionally substituted up to 3 times, identically or differently, by a halogen, hydroxyl, nitro, trifluoromethyl, carboxy, a linear or branched alkyl, alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 6 carbon atoms or by a group with formula $-(V)_c-NR^{15}R^{16}$ and/or $-OR^{17}$; wherein |
| c | is the number 0 or 1; |
| V | represents a residue with formula $-CO$ or $-SO_2$; |
| $R^{15}$ and $R^{16}$ | are identical or different and have the meaning given for $R^3$ and $R^4$ above; |
| $R^{17}$ | represents hydrogen, a linear or branched alkenyl containing up to 8 carbon atoms or a linear or branched alkyl containing up to 8 carbon atoms, optionally substituted up to 3 times, identically or differently, with hydroxyl, carbonyl or linear or branched alkoxycarbonyl containing up to 5 carbon atoms; and/or the cycles are optionally substituted by an aryl containing 6 to 10 carbon atoms or by a 5- to 7-membered aromatic, optionally benzocondensed heterocycle containing up to 3 heteroatoms selected from S, N and/or O, which in its turn is optionally substituted up to two times, identically or differently, by a halogen, hydroxyl, nitro, carboxyl, trifluoromethyl or a linear or branched alkyl, alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 5 carbon atoms or with a group with formula$(V')_d-NR^{18}R^{19}$; wherein |
| d | has the meaning given above for a and is identical thereto or different therefrom; |
| $R^{18}$ and $R^{19}$ | have the meaning given above for $R^3$ and $R^4$ and are identical thereto or different therefrom; |

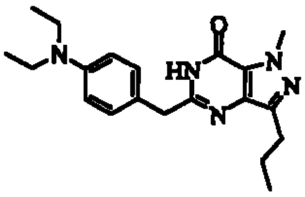
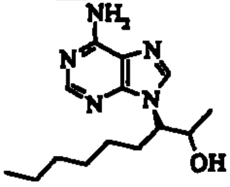
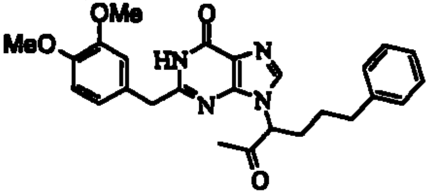
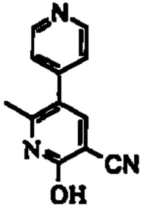
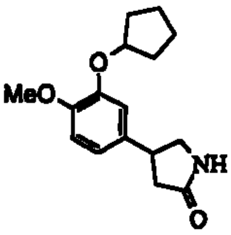
| | |
|---|---|
| $V'$ | has the meaning given above for V and is identical thereto or different therefrom; and/or<br>represents the ring system given below for D, optionally substituted by a linear or branched acyl containing up to 5 carbon atoms, optionally substituted by hydroxyl, a linear or branched alkoxy containing up to 5 carbon atoms or by a group with formula $-NR^{20}R^{21}$; wherein |
| $R^{20}$ and $R^{21}$ | are identical or different and have the meaning given above for $R^3$ and $R^4$; or |
| E | Represents a residue with formula $-CH_2-Y-Z-$; wherein |
| Y | Represents a bond or an oxygen or sulphur atom or the group –NH-; |
| Z | Represents a linear or branched alkyl chain containing up to 5 carbon atoms; |
| D | represents a residue with formula |



and tautomers and salts thereof.

1535

Preferred I:PDEs are selected from the following structures:

| **Compound** | **Structure** | **Mode of action**<br>**References** |
|---|---|---|
| | | |
| **FIa** |  | I:PDE1<br>EP-A-0911333<br>(Example 50) |
| **FIb** |  | I:PDE2<br>EHNA<br>(also an inhibitor of Adenosinedeaminase) |
| FII |  | I:PDE2<br>EP-A-0771799<br>(Example 100) |
| FIII |  | I:PDE3<br>Milrinone<br>(which is commercially available) |
| FIV |  | I:PDE4<br>Rolipram<br>(which is commercially available) |

NEP (neutral endopeptidase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is NEP.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for NEP is available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

In one aspect, the NEP is NEP (EC 3.4.24.11) (also known as enkephalinase or endopeptidase-2). Here, we have found NEP EC 3.4.24.11 mRNA and expressed protein in human and rabbit vagina.

Here, we believe that in females including those suffering from FSAD, VIP is degraded by NEP EC3.4.24.11. Thus, NEP inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of VIP released during arousal. This will lead to a treatment of FSAD, such as through enhanced vaginal engorgement. We have shown that selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 enhance pelvic nerve-stimulated and VIP-induced increases in genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow. In addition that selective NEP inhibitors enhance VIP and nerve-mediated relaxations of isolated vagina wall.

Background teachings on NEP have been presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning NEP has been extracted from that source.

> "Common acute lymphocytic leukemia antigen is an important cell surface marker in the diagnosis of human acute lymphocytic leukemia (ALL). It is present on leukemic cells of pre-B phenotype, which represent 85% of cases of ALL. CALLA is not restricted to leukemic cells, however, and is found on a variety of normal tissues. CALLA is a glycoprotein that is particularly abundant in kidney, where it is present on the brush border of proximal tubules and on glomerular epithelium. Letarte et al. (1988) cloned a cDNA coding for CALLA and showed that the amino acid sequence deduced from the cDNA sequence is identical to that of human membrane-associated neutral endopeptidase (NEP; EC 3.4.24.11 ), also known as enkephalinase. NEP cleaves peptides at the amino side of hydrophobic residues and inactivates several peptide hormones including glucagon, enkephalins, substance P, neurotensin, oxytocin, and bradykinin. By cDNA transfection analysis, Shipp et al. (1989) confirmed that CALLA is a functional neutral endopeptidase of the type that has

previously been called enkephalinase. Barker et al. (1989) demonstrated that the CALLA gene, which encodes a 100-kD type II transmembrane glycoprotein, exists in a single copy of greater than 45 kb which is not rearranged in malignancies expressing cell surface CALLA. The gene was located to human chromosome 3 by study of somatic cell hybrids and in situ hybridization regionalized the location to 3q21-q27. Tran-Paterson et al. (1989) also assigned the gene to chromosome 3 by Southern blot analysis of DNA from human-rodent somatic cell hybrids. D'Adamio et al. (1989) demonstrated that the CALLA gene spans more than 80 kb and is composed of 24 exons."

## I:NEP

As indicated above, the agent may be any suitable agent that can act as an I:NEP.

Broad aspects of this aspect of the present invention therefore relate to:

a) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD (preferably FSAD); the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NEP.

b) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD (preferably FSAD); wherein said agent is an I:NEP.

c) A method of treating a female suffering from FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NEP.

d) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NEP.

e) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is an I:NEP.

f) A method of treating a female for FSD (preferably FSAD) or to prevent FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an I:NEP.

Other preferred aspects of the present invention encompass:

A) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NEP.

B) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD, and wherein said agent is an I: NEP.

C) A method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I: NEP.

D) An assay method for identifying an agent that can be used to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: determining whether an agent can directly or indirectly potentiate cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD; and wherein said agent is an I: NEP.

E) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female;

wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I: NEP.

F) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; and wherein said agent is an I: NEP.

G) A method of treating a female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the female so as to cause enhanced genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; and wherein said agent is an I: NEP.

Details on a suitable assay system for identifying and/or studying an I:NEP are presented in the following section.

I:NEPs are discussed in the following review articles:

Pathol. Biol., 46(3), 1998, 191.
Current Pharm. Design, 2(5), 1996, 443.
Biochem. Soc. Trans., 21(3), 1993, 678.
Handbook Exp. Pharmacol., 104/1, 1993, 547.
TIPS, 11, 1990, 245.
Pharmacol. Rev., 45(1), 1993, 87.
Curr. Opin. Inves. Drugs, 2(11), 1993, 1175.
Antihypertens. Drugs, (1997), 113.
Chemtracts, (1997), 10(11), 804.
Zinc Metalloproteases Health Dis. (1996), 105.
Cardiovasc. Drug Rev., (1996), 14(2), 166.
Gen. Pharmacol., (1996), 27(4), 581.
Cardiovasc. Drug Rev., (1994), 12(4), 271.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., (1995), 22(1), 63.
Cardiovasc. Drug Rev., (1991), 9(3), 285.
Exp. Opin. Ther. Patents (1996), 6(11), 1147.

I:NEPs are disclosed in the following documents:

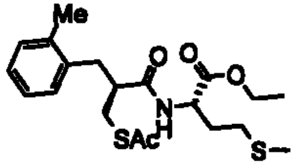
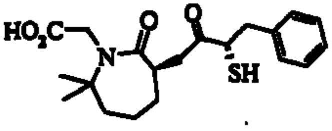
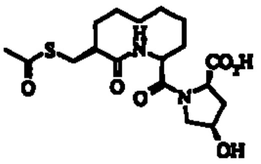
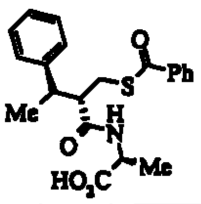
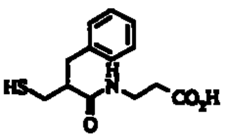
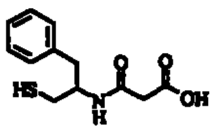
EP-509442A
US-192435
US-4929641
EP-599444B
US-884664
EP-544620A
US-798684
J. Med. Chem. 1993, 3821.
Circulation 1993, 88(4), 1.
EP-136883
JP-85136554
US-4722810
Curr. Pharm. Design, 1996, 2, 443.
EP-640594
J. Med. Chem. 1993, 36(1), 87.
EP-738711-A
JP-270957
CAS # 115406-23-0
DE-19510566
DE-19638020
EP-830863
JP-98101565
EP-733642
WO9614293
JP-08245609
JP-96245609
WO9415908
JP05092948
WO-9309101
WO-9109840
EP-519738
EP-690070
J. Med. Chem. (1993), 36, 2420.
JP-95157459
Bioorg. Med. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65.

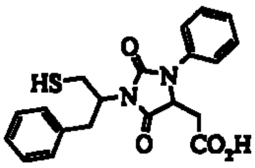
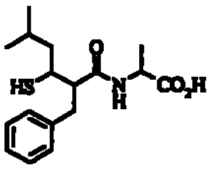
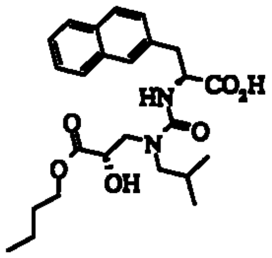
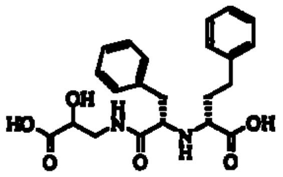
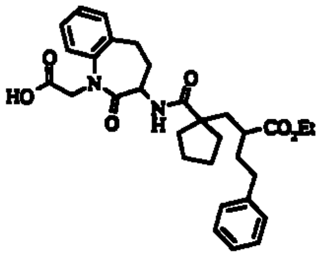
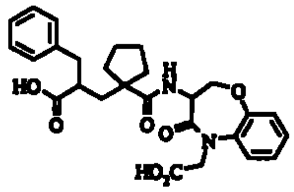
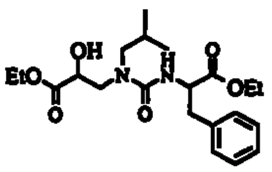
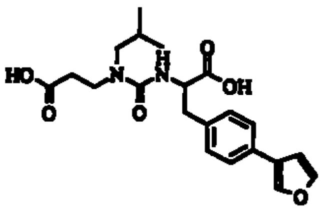
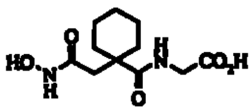
Preferred I:NEPs are disclosed in the following documents:

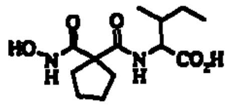
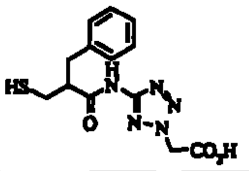
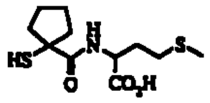
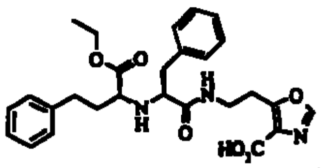
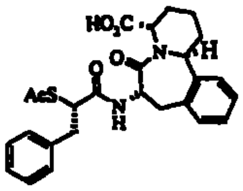
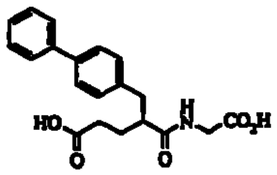
1538

EP-A-0274234
JP-88165353
Biochem.Biophys.Res. Comm.,1989, 164, 58
EP-629627-A
US-77978
Perspect. Med. Chem. (1993), 45.
EP-358398-B

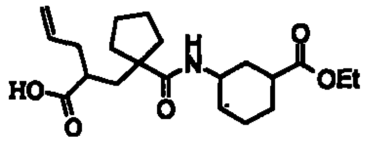
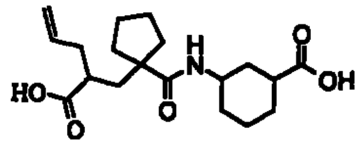
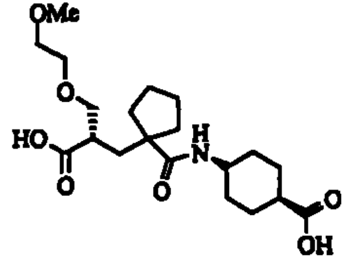
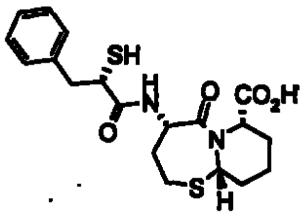
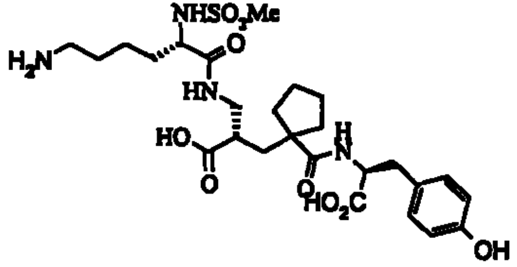
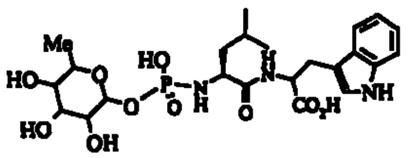
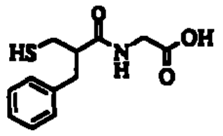
Preferred examples of I:NEPs are selected from the following structures:

| Compound | Structure | Mode of Action<br>References |
|---|---|---|
| | | |
| FXII |  | I:NEP<br>EP-509442A<br>US-192435<br>US-4929641 |
| FXIII |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>EP-599444B<br>US-884664 |
| FXIV |  | I:NEP<br>EP-544620A<br>US-798684<br>J. Med. Chem.<br>1993, 3821. |
| FXV |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>Mixanpril<br>Circulation<br>1993, 88(4), 1. |
| FXVI |  | I:NEP<br>EP-136883<br>JP-85136554<br>US-4722810 |
| FXVII |  | I:NEP<br>Retrothiorphan<br>Curr. Pharm. Design,<br>1996, 2, 443. |

| | | |
|---|---|---|
| FXVIII |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>EP-640594 |
| FXIX |  | I:NEP<br>J. Med. Chem.<br>1993, 36(1), 87. |
| FXX |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>EP-738711-A<br>JP-270957 |
| FXXI |  | I:NEP<br>CAS #<br>115406-23-0 |
| FXXII |  | I:NEP<br>(also an ECE inhibitor)<br>DE-19510566<br>DE-19638020<br>EP-830863<br>JP-98101565 |
| FXXIII |  | I:NEP<br>(also an ECE inhibitor)<br>EP-733642 |
| FXXIV |  | I:NEP<br>WO96/14293 |
| FXXV |  | I:NEP<br>JP-08245609<br>JP-96245609 |
| FXXVI |  | I:NEP<br>WO9415908 |

| | | |
|---|---|---|
| FXXVII |  | I:NEP<br>JP05092948 |
| FXXVIII |  | I:NEP<br>WO-9309101 |
| FXXIX |  | I:NEP<br>WO-9109840 |
| FXXXI |  | I:NEP<br>EP-519738<br>EP-690070 |
| FXXXII |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>J. Med. Chem. (1993), 36, 2420. |
| FXXXIII |  | I:NEP<br>JP-95157459<br>Bioorg. Med. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65. |

More preferred I:NEPs are selected from the following structures:

| **Compound** | **Structure** | **Mode of Action**<br>**References** |
|---|---|---|
| | | |
| FV |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(Example 300) |
| FVI |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(Example 379) |
| FVII |  | I:NEP<br>Candoxatrilat<br>EP-274234<br>JP-88165353<br>Biochem.Biophys.Res. Comm.,1989, 164, 58 |
| FVIII |  | I:NEP<br>Omapatrilat<br>(also an inhibitor of ACE)<br>EP-0629627-A<br>US-77978 |
| FIX |  | I:NEP<br>Sampatrilat<br>(also an inhibitor of ACE)<br>Perspect. Med. Chem. (1993), 45.<br>EP-0358398-B |
| FX |  | I:NEP<br>Phosphoramidon<br>(which is commercially available) |
| FXI |  | I:NEP<br>Thiorphan<br>(which is commercially available) |

## NEP ASSAY

## THE PREPARATION AND ASSAY OF SOLUBLE (NEP) NEUTRAL ENDOPEPTIDASE FROM CANINE, RAT, RABBIT AND HUMAN KIDNEY CORTEX.

Soluble NEP is obtained from the kidney cortex and activity is assayed by measuring the rate of cleavage of the NEP substrate Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp to generate its fluorescent product, Abz-D-Arg-Arg.

### EXPERIMENTAL PROCEDURE:-

### 1. MATERIALS

All water is double de ionised.

1.1 Tissues

| | |
|---|---|
| Human Kidney | IIAM (Pennsylvania. U.S.A.) |
| Rat Kidney | |
| Rabbit Kidney | |
| Canine Kidney | |

1.2 Homogenisation medium

100mM Mannitol and 20mM Tris @ pH 7.1

2.42g Tris (Fisher T/P630/60) is diluted in 1 litre of water and the pH adjusted to 7.1 using 6M HCl at room temperature. To this 18.22g Mannitol (Sigma M-9546) is added.

1.3 Tris buffer (NEP buffer).

50ml of 50mM Tris pH 7.4 (Sigma T2663) is diluted in 950ml of water.

1.4 Substrate (Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp)

Made to order from SNPE, and is stored as a powder at –20°C. A 2mM stock is made by gently re-suspending the substrate in Tris buffer, this should not be vortexed or sonicated. 600µl aliquots of the 2mM stock are stored at –20 for up to one month. (Medeiros, M.A.S., Franca, M.S.F. et al., (1997), Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 30, 1157-1162).

1.5 Total product

Samples corresponding to 100% substrate to product conversion are included on the plate to enable the % substrate turnover to be determined. The total product is generated by incubating 1ml of 2mM substrate with 20µl of enzyme stock for 24 hours at 37°C.

1.6 Stop solution.

A 300µM stock of Phosphoramidon (Sigma R7385) is made up in NEP buffer and stored in 50µl aliquots at -20.

1.7 Dimethyl sulphoxide (DMSO).

1.8 Magnesium Chloride -$MgCl_2.6H_2O$ (Fisher M0600/53).

1.9 Black 96 well flat bottom assay plates (Costar 3915).

1.10 Topseal A (Packard 6005185).

1.11 Centrifuge tubes

## 2. SPECIFIC EQUIPTMENT

2.1 Sorvall RC-5B centrifuge (SS34 GSA rotor, pre-cooled to 4°C).

2.2 Braun miniprimer mixer.

2.3 Beckman CS-6R centrifuge.

2.4 Fluostar galaxy.

2.5 Wesbart 1589 shaking incubator.

## 3. METHODS

3.1 TISSUE PREPARATION

3.2 Dog, rat, rabbit, and human NEP is obtained from the kidney cortex using a method adapted from Booth, A.G. & Kenny, A.J. (1974) *Biochem. J.* 142, 575-581.

3.3 Frozen kidneys are allowed to thaw at room temperature and the cortex is dissected away from the medulla.

3.4 The cortex is finely chopped and homogenised in approximately 10 volumes of homogenisation buffer (1.2) using a Braun miniprimer (2.2).

3.5 Magnesium chloride (1.8) (20.3mg/gm tissue) is added to the homogenate and stirred in an ice-water bath for 15 minutes.

3.6 The homogenate is centrifuged at 1,500g (3,820rpm) for 12 minutes in a Beckman centrifuge (2.3) before removing the supernatant to a fresh centrifuge tube and discarding the pellet.

3.7 The supernatant is centrifuged at 15,000g (12,100rpm) for 12 minutes in a Sovall centrifuge (2.1) and the supernatant is discarded.

3.8 The pale pink layer on the top of the remaining pellet is removed and re-suspended in homogenisation buffer containing magnesium chloride (9mg MgCl in 5ml buffer per 1g tissue).

3.9 The suspension is centrifuged at 2,200g (4,630rpm) for 12 minutes in a Beckman centrifuge (2.3) before discarding the pellet.

3.10 The supernatant is centrifuged at 15,000g (12,100rpm) for 12 minutes using the Sorvall centrifuge (2.1) and the supernatant is discarded.

3.11 The final pellet is resuspended in homogenisation buffer containing magnesium chloride (0.9mg MgCl in 0.5ml buffer per 1g tissue). A homogenous suspension is obtained using a Braun miniprimer (2.2). This is then frozen down in 100µl aliquots to be assayed for NEP activity.

## 4.0 DETERMINATION OF NEP ACTIVITY

The activity of the previously aliquoted NEP is measured by its ability to cleave the NEP specific peptide substrate.

4.1 A 4% DMSO/NEP buffer solution is made (4mls DMSO in 96mls NEP buffer).

4.2 Substrate, total product, enzyme, and Phosphoramidon stocks are left on ice to thaw.

4.3 50µl of 4% DMSO/NEP buffer solution is added to each well.

4.4 The 2mM substrate stock is diluted 1:40 to make a 50µM solution. 100µl of 50µM substrate is added to each well (final concentration 25µM).

4.5 50µl of a range of enzyme dilutions is added to initiate the reaction (usually 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, and 1:3200 are used). 50µl of NEP buffer is added to blank wells.

4.6 The 2mM total product is diluted 1:80 to make a 25µM solution. 200µl of 25µM product is added to the first four wells of a new plate.

4.7 Plates are incubated at 37oC in a shaking incubator for 60 minutes.

4.8 The 300µM Phosphoramidon stock is diluted 1:100 to 300nM. The reaction is stopped by the addition of 100µl 300nM Phosphoramidon and incubated at 37°C in a shaking incubator for 20 minutes before being read on the Fluostar (ex320/em420).

## 5. NEP INHIBITION ASSAYS

5.1 Substrate, total product, enzyme and Phoshoramidon stocks are left on ice to thaw.

5.2 Compound stocks are made up in 100% DMSO and diluted 1:25 in NEP buffer to give a 4% DMSO solution. All further dilutions are carried out in a 4% DMSO solution (4mls DMSO in 96mls NEP buffer).

5.3 50µl of compound in duplicate is added to the 96 well plate and 50µl of 4% DMSO/NEP buffer is added to control and blank wells.

5.4 The 2mM substrate stock is diluted 1:40 in NEP buffer to make a 50µM solution (275µl 2mM substrate to 10.73ml buffer is enough for 1 plate).

5.5 The enzyme stock diluted in NEP buffer (determined from activity checks).

5.6 The 2mM total product stock is diluted 1:80 in NEP buffer to make a 25µM solution. 200µl is added to the first four wells of a separate plate.

5.7 The 300µM Phosphoramidon stock is diluted 1:1000 to make a 300nM stock (11µl Phosphoramidon to 10.99ml NEP buffer.

5.8 To each well in the 96 well plate the following is added:

Table Reagents to be added to 96 well plate.

| | Compound/ DMSO | Tris Buffer | Substrate | NEP enzyme | Total product |
|---|---|---|---|---|---|
| Samples | 2µl compound | 50µl | 100µl | 50µl | None |
| Controls | 2µl DMSO | 50µl | 100µl | 50µl | None |
| Blanks | 2µl DMSO | 100µl | 100µl | None | None |
| Totals | 2µl DMSO | None | None | None | 200µl |

5.9 The reaction is initiated by the addition of the NEP enzyme before incubating at 37°C for 1 hour in a shaking incubator.

5.10 The reaction is stopped with 100µl 300nM Phosphoramidon and incubated at 37°C for 20 minutes in a shaking incubator before being read on the Fluostar (ex320/em420).

## 6. CALCULATIONS

The activity of the NEP enzyme is determined in the presence and absence of compound and expressed as a percentage.

% Control activity (turnover of enzyme):

$$\frac{\text{Mean FU of controls} - \text{Mean FU of blanks}}{\text{Mean FU of totals} - \text{Mean FU of blanks}} \times 100$$

% Activity with inhibitor:

$$\frac{\text{Mean FU of compound} - \text{Mean FU of blanks}}{\text{Mean FU of totals} - \text{Mean FU of blanks}} \times 100$$

Activity expressed as % of control:

$$\frac{\text{\% Activity with inhibitor}}{\text{\% Control activity}} \times 100$$

A sigmoidal dose-response curve is fitted to the % activities (% of control) vs compound concentration and IC50 values calculated using LabStats fit-curve in Excel.

NPY (neuropeptide Y)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is NPY or one of its associated receptors.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for NPY and its receptors are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

Here, we have found that neuropeptide Y (NPY) exerts an inhibitory regulatory influence over vasoactive intestinal peptide (VIP)-mediated vasorelaxation. Thus, inhibition of NPY receptors will result in an increased pelvic nerve and VIP-mediated increases in genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow. Clinically this will lead to increased vaginal and/or clitoral engorgement which will ultimately lead to increased lubrication *via* plasma transudation and increased vaginal compliance. Hence, a suitable target for the treatment of FSAD is NPY or one of its associated receptors.

Thus, in one preferred aspect, the agent is an NPY $Y_1$ $Y_2$ or $Y_5$ antagonist, preferably an oral NPY $Y_1$ $Y_2$ or $Y_5$ antagonist. This agent will treat FSAD by increasing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow and increasing lubrication.

The NPY-mediated antagonism of VIP-induced increases in blood flow therefore represents a potential therapeutic target by which blood flow in the female genital tract can be influenced. The mechanism through which this antagonism occurs is most likely through NPY $Y_1$ receptor-induced $G_{i/o}$ activation. In other physiological systems NPY $Y_1$ receptors have been implicated in mediating vasoconstriction and inhibiting sympathetic transmitter release (Lundberg *et al.*, 1996; a NPY $Y_2$ effect can not be excluded). We believe in the female genital tract that NPY inhibits vasorelaxation via direct inhibition of adenylate cyclase direct inhibiting VIP release or sympathetic neurotransmission.

As indicated, a $P_{cAMP}$ target is one of the NPY receptors.

The neuronal release of NPY regulates the VIP-induced vasorelaxation of the vaginal vascular bed. This most likely occurs *via* a presynaptic mechanism involving NPY $Y_1$ receptors, although a post-synaptic mode of action can not be excluded. An NPY antagonist will potentiate VIP-induced vasodilation of the vaginal vascular beds. Clinically this will lead to increased vaginal lubrication and compliance *via* vaginal wall engorgement.

NPY receptor expression studies performed by us have identified NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes within the human vagina.

Hence, in one aspect, the $P_{cAMP}$ target is one or more of the NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes.

Background teachings on NPY and it associated receptors have been prepared by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning NPY has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY) is an abundant and widespread peptide in the mammalian nervous system. It shows sequence homology to peptide YY and over 50% homology in amino acid and nucleotide sequence to pancreatic polypeptide (PNP; 167780). NPY is a 36-amino acid peptide. Minth et al. (1984) cloned the NPY gene starting from mRNA of a pheochromocytoma. Takeuchi et al. (1985, 1986) isolated cDNA clones of the NPY and PNP genes from a pheochromocytoma and a pancreatic endocrine tumor, respectively. Using these cDNA probes to analyze genomic DNA from chromosome assignment panels of human-mouse somatic cell hybrids, they then examined the question of whether the genes are syntenic. The studies showed nonsynteny, with NPY on 7pter-7q22 and PNP on 17p11.1-17qter. By studies of a backcross with Mus spretus, Bahary et al. (1991) mapped the homologous NPY gene to mouse chromosome 6. Since mouse chromosome 6 has homology to human 7q, it is likely that the NPY gene in man is located in the region 7cen-q22. Meisler et al. (1987) excluded close linkage between the loci for cystic fibrosis (219700) and neuropeptide Y. Terenghi et al. (1987) determined the distribution of mRNA encoding NPY in neurons of the cerebral cortex in surgical biopsy specimens and postmortem brain by means of in situ hybridization techniques. They showed consistent localization of NPY gene transcription and expression in normal mature cortical neurons. Baker et al. (1995) showed by fluorescence in situ hybridization that the NPY gene is located on 7p15.1 and exists in single copy. They commented that NPY is one of the most highly conserved peptides known, with, for example, only 3 amino acid differences between human and shark. Neuropeptide Y is a neuromodulator implicated in the control of energy balance and is overproduced in the hypothalamus of ob/ob mice. To determine the role of NPY in the response to leptin (164160) deficiency, Erickson et al. (1996) generated ob/ob mice deficient in

NPY. In the absence of NPY, ob/ob mice were less obese because of reduced food intake and increased energy expenditure, and were less severely affected by diabetes, sterility, and somatotropic defects. These results were interpreted as indicating that NPY is a central effector of leptin deficiency. Genetic linkage analysis of rats that were selectively bred for alcohol preference identified a chromosomal region that included the NPY gene (Carr et al., 1998). Alcohol-preferring rats had lower levels of NPY in several brain regions compared with alcohol-nonpreferring rats. Thiele et al. (1998) therefore studied alcohol consumption by mice that completely lacked NPY as a result of targeted gene disruption (Erickson et al., 1996). They found that NPY-deficient mice showed increased consumption, compared with wildtype mice, of solutions containing 6%, 10%, and 20% (by volume) ethanol. NPY-deficient mice were also less sensitive to the sedative/hypnotic effects of ethanol, as shown by more rapid recovery from ethanol-induced sleep, even though plasma ethanol concentrations did not differ significantly from those of controls. In contrast, transgenic mice that overexpressed a labeled NPY gene in neurons that usually express it had a lower preference for ethanol and were more sensitive to the sedative/hypnotic effects of ethanol than controls. These data provided direct evidence that alcohol consumption and resistance are inversely related to NPY levels in the brain. As part of an on-going study of the genetic basis of obesity, Karvonen et al. (1998) identified a 1128T-C polymorphism that resulted in substitution of leucine by proline at residue 7 in the signal peptide part of pre-pro-NPY. This polymorphism was not associated with obesity or energy metabolism, but was significantly and consistently associated with high serum total and LDL cholesterol levels both in normal-weight and obese Finns and in obese Dutch subjects. Uusitupa et al. (1998) found the pro7 polymorphism in 14% of Finns but in only 6% of Dutchmen. Subjects with pro7 in NPY had, on average, 0.6 to 1.4 mmol/L higher serum total cholesterol levels than those without this gene variant. As the impact of pro7 NPY on serum cholesterol levels could not be found in normal-weight Dutchmen, it can be assumed that obese persons may be more susceptible to the effect of the gene variant. It was calculated that the probability of having the pro7 in NPY could be as high as 50 to 60% in obese subjects with a total serum cholesterol equal to or higher than 8 mmol/L. At least among Finns, the pro7 form of NPY is one of the strongest genetic factors affecting serum cholesterol levels. SEE ALSO Allen and Bloom (1986) ; Dockray (1986) ; Maccarrone and Jarrott (1986) ; Minth et al. (1986)."

As indicated background teachings on NPY and it associated receptors have been prepared by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning NPYR1 has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY; 162640) is one of the most abundant neuropeptides in the mammalian nervous system and exhibits a diverse range of important physiologic activities, including effects on psychomotor activity, food intake, regulation of central endocrine secretion, and potent vasoactive effects on the cardiovascular system. Two major subtypes of NPY (Y1 and Y2) have been defined by pharmacologic criteria. The NPY Y1 receptors have been identified in a variety of tissues, including brain, spleen, small intestine, kidney, testis, placenta, and aortic smooth muscle. The Y2 receptor is found mainly in the central nervous system. Herzog et al. (1992) reported cloning of a cDNA encoding a human NPY receptor which they confirmed to be a member of the G protein-coupled receptor superfamily. When expressed in Chinese hamster ovary (CHO) or human embryonic kidney cells, the receptor exhibited characteristic ligand specificity. In the kidney cell line, the receptor was coupled to a pertussis toxin-sensitive G protein that mediated the inhibition of cyclic AMP accumulation. In the CHO cell line, on the other hand, the receptor was coupled not to inhibition of adenylate cyclase but rather to the elevation of intracellular calcium. Thus the second messenger coupling of the NPY receptor was cell type specific, depending on the specific repertoire of G proteins and effector systems present in the cell type. Larhammar et al. (1992) independently cloned and characterized the neuropeptide Y receptor. Herzog et al. (1993) determined the molecular organization and regulation of the human NPY Y1 receptor gene. In contrast to the contiguous structure of most G protein-coupled receptor genes, they found that the NPY Y1 receptor gene has 3 exons. They also identified a common PstI polymorphism in the first intron of the gene. By high resolution fluorescence in situ hybridization, they localized the gene to 4q31.3-q32. Herzog et al. (1997) found that the NPY1R and NPY5R (602001) genes are colocalized on chromosome 4q31-q32. The 2 genes are transcribed in opposite directions from a common promoter region. One of the alternately spliced 5-prime exons of the Y1 receptor gene is a part of the coding sequence of the Y5 receptor. This unusual arrangement suggested to Herzog et al. (1997) that the 2 genes arose by a gene duplication event and that they may be coordinately expressed. By interspecific backcross analysis, Lutz et al. (1997) mapped the Npy1r and Npy2r genes to conserved linkage groups on mouse chromosomes 8 and 3, respectively, which correspond to the distal region of human chromosome 4q."

As indicated background teachings on NPY and it associated receptors has been prepared by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning NPYR2 has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY) signals through a family of G protein-coupled receptors present in the brain and sympathetic neurons. At least 3 types of neuropeptide Y receptor have been defined on the basis of pharmacologic criteria, tissue distribution, and structure of the encoding gene; see 162641 and 162643. Rose et al. (1995) reported the expression cloning in COS cells of a cDNA for the human type 2 receptor, NPY2R. Transfected cells showed high affinity for NPY (162640), peptide YY (PYY; 600781), and a fragment of NPY including amino acids 13 to 36. The predicted 381-amino acid protein has 7 transmembrane domains characteristic of G protein-coupled receptors and is only 31% identical to the human Y1 receptor (NPY1R; 162641). A 4-kb mRNA was detected on Northern blots of tissue samples from several regions of the nervous system. Gerald et al. (1995) cloned the cDNA corresponding to the human Y2 receptor from a human hippocampal cDNA expression library using a radiolabeled PYY-binding assay. They expressed the Y2 gene in COS-7 cells and performed a hormone-binding assay which showed that the Y2 receptor binds (from highest to lowest affinity) PYY, NPY, and pancreatic polypeptide (PP; 167780) hormones. Ammar et al. (1996) cloned and characterized the human gene encoding the type 2 NPY receptor. The transcript spans 9 kb of genomic sequence and is encoded in 2 exons. As in the type 1 NPY receptor gene, the 5-prime untranslated region of NPY2R is interrupted by a 4.5-kb intervening sequence. Ammar et al. (1996) demonstrated by Southern analysis of rodent-human cell hybrids followed by fluorescence in situ hybridization (FISH) that the NPY2R gene maps to 4q31, the same region containing the NPY1R gene, suggesting that these subtypes may have arisen by gene duplication despite their structural differences. By interspecific backcross analysis, Lutz et al. (1997) mapped the Npy1r and Npy2r genes to conserved linkage groups on mouse chromosomes 8 and 3, respectively, which correspond to the distal region of human chromosome 4q."

An assay for determining whether a putative or actual agent according to the present invention can bind to NPY is presented in WO-A-98/52890 (see page 96 thereof, lines 2 to 28).

## I:NPY

As indicated above, the agent may be any suitable agent that can act as an I:NPY (sometimes referred to as an NPY antagonist).

Broad aspects of this aspect of the present invention therefore relate to:

a) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD (preferably FSAD); the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NPY.

b) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD (preferably FSAD); wherein said agent is an I:NPY.

c) A method of treating a female suffering from FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NPY.

d) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NPY.

e) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is an I:NPY.

f) A method of treating a female for FSD (preferably FSAD) or to prevent FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an I:NPY.

Other aspects of the present invention encompass:

A) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NPY.

B) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD, and wherein said agent is an I: NPY.

C) A method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I: NPY.

D) An assay method for identifying an agent that can be used to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: determining whether an agent can directly or indirectly potentiate cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD; and wherein said agent is an I: NPY.

E) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I: NPY.

F) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; and wherein said agent is an I: NPY.

G) A method of treating a female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the

female so as to cause enhanced genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; and wherein said agent is an I: NPY.

I:NPYs (in particular NPY antagonists) are discussed in the following review articles:

Dunlop J, Rosenzweig-Lipson S : Therapeutic approaches to obestity Exp Opin Ther Pat 1999 8 12 1683 -1694

Wang S, Ferguson KC, Burris TP, Dhurandhar NV: 8th annual international conference on obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus: novel drug developments. Exp Opin Invest Drugs 1999 8 7 1117 -1125

Ling AL : Neuropeptide Y receptor antagonists Exp Opin Ther Pat 1999 9 4 375-384

Adham N, Tamm J, Du P, Hou C, et al : Identification of residues involved in the binding of the antagonist SNAP 6608 to the Y5 receptor Soc Neurosci Abstr 1998 24 part 2 626.9

Shu YZ, Cutrone JQ, Klohr SE, Huang S : BMS-192548, a tetracyclic binding inhibitor of neuropeptide Y receptors, from Aspergillus niger WB2346. II. Physico-chemical properties and structural characterization J Antibiot 1995 48 10 1060-1065

Rigollier P, Rueger H, Whitebread S, Yamaguchi Y, Chiesi M, Schilling W, Criscione L : Synthesis and SAR of CGP 71683A, a potent and selective antagonist of the neuropeptide Y Y5 receptor. Int Symp Med Chem 1998 15th Edinburgh 239

Criscione L, Rigollier P, Batzl-Hartmann C, Rueger H, Stricker-Krongrad A, et al : Food intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. J Clin Invest 1998 102 12 2136 -2145

Neurogen Corp : NGD 95-1 Clin Trials Monitor 1996 5 10 Ab 19244

Buttle LA : Anti-obesity drugs: on target for huge market sales. Exp Opin Invest Drugs 1996 5 12 1583 -1587

Gehlert DR, Hipskind PA : Neuropeptide Y receptor antagonists in obesity. Exp Opin Invest Drugs 1996 7 9 1827 -1838

Goldstein DJ, Trautmann ME : Treatments for obesity. Emerging Drugs 1997 2 – 1-27

Hipskind P A, Lobb K L, Nixon J A, Britton T C, Bruns R F, Catlow J, Dieckman McGinty D K, Gackenheimer S L, Gitter B D, Iyengar S, Schober D A, et al. : Potent and selective 1,2,3-trisubstituted indole NPY Y-1 antagonists. J Med Chem 1997 40 3712 –3714

Zimmerman DM, Cantrall BE, Smith ECR, Nixon JA, Bruns RF, Gitter B, Hipskind PA, Ornstein PL, Zarrinmayeh H, Britton TC, Schober DA, Gehlert DR: Structure-

activity relationships of a series of 1-substituted-4-methylbenzimidazole neuropeptide Y-1 receptor antagonists Bioorganic Med Chem Lett 1998 8 5 473 –476

Zarrinmayeh H, Nunes A, Ornstein P, Zimmerman D, Arnold MB, et al : Synthesis and evaluation of a series of novel 2-[(4-chlorophenoxy)methyl]benzimidazoles as selectiveneuropeptide Y Y1 receptor antagonists J Med Chem 1998 41 15 2709 – 2719

Britton TC, Spinazze PG, Hipskind PA, Zimmerman DM, Zarrinmayeh H, Schober DA, Gehlert DR, Bruns RF : Structure-activity relationships of a series of benzothiophene-dervied NPY-Y1 antagonists: optimization of the C2 side chain Bioorganic Med Chem Lett 1999 9 3 475 -480

Zarrinmayeh H, Zimmerman DM, Cantrell BE, Schober DA, Bruns RF, Gackenheimer SL, Ornstein PL, Hipskind PA, Britton TC, Gehlert DR : Structure-activity relationship of a series of diaminoalkyl substituted benzimidazole as neuropeptide Y Y1 receptor antagonists Bioorganic Med Chem Lett 1999 9 5 647 -652

Murakami Y, Hara H, Okada T, Hashizume H, Kii M, Ishihara Y, Ishikawa M, Mihara S-I, Kato G, Hanasaki K, Hagishita S, Fujimoto M : 1,3-disubstituted benzazepines as novel, potent, selective neurpeptide Y Y1 receptor antagonists J Med Chem 1999 42 14 2621-2632

Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Beck Sickinger AG, Doods HN : The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur J Pharmacol 1994 271 2-3 R11 -R13

Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Doods HN : Subtype selectivity and antagonbist profile of the nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226 J Pharmacol Exp Ther 1995 275 1 143 –149.

Wright J, Bolton G, Creswell M, Downing D, Georgic L, Heffner T, Hodges J, MacKenzie R, Wise L : 8-amino-6-(arylsulphonyl)-5-nitroquinolones: novel nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonists Bioorganic Med Chem Lett 1996 6 15 1809 -1814

Capurro D, Huidobro-Toro JP : The involvement of neyropeptide Y Y1 receptors in the blood pressure baroreflex:studies with BIBP 3226 and BIB 3304. Eur J Pharmacol 1999 376 3 251 –255

Dumont Y, Cadieux A, Doods H, Quirion R : New tools to investigate neuropeptide Y receptors in the central and peripheral nervous systems: BIBO-3304 (Y1), BIIE-246 (Y2) and [125I]-GR-231118 (Y1/Y4). Soc Neurosci Abstr 1999 25 Part 1 Abs 74.11

Hegde SS, Bonhaus DW, Stanley W, Eglen RM, Moy TM, Loeb M, et al : Pharmacological evaluation of 1229U91, a high affinity and selective neuropeptide Y(NPY) - Y1 receptor antagonist Pharmacol Res 1995 31 190

Matthews JE, Chance WT, Grizzle MK, Heyer D, Daniels AJ : Food intake inhibition and body weight loss in rats treated with GI 264879A, an NPY-Y1 receptor. Soc Neurosci Abstr 1997 23 Pt 2 1346

Doods HN, Willim K-D, Smith SJ : BIBP 3226: a selective and highly potent NPY-Y1 antagonist Proc Br Pharmacol Soc 1994 13-16 Dec. C47

Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Beck Sickinger AG, Doods HN : The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur J Pharmacol 1994 271 2-3 R11 -R13

Serradeil-Le-Gal C, Valette G, Rouby PE, Pellet A, Villanova G, Foulon L, Lespy L, Neliat G, Chambon JP, Maffrand JP, Le-Fur G : SR 120107A and SR 120819A: Two potent and selective, orally-effective antagonists for NPY Y1 receptors Soc Neurosci Abstr 1994 20 Pt 1 907 -Abs 376.14

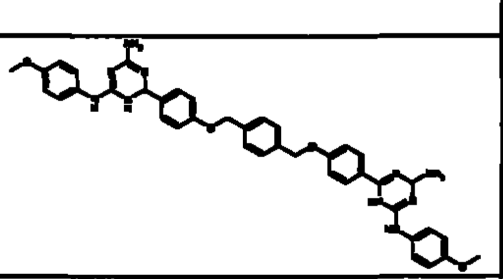
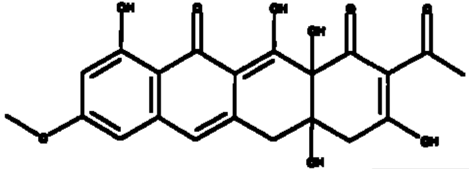
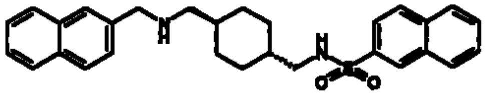
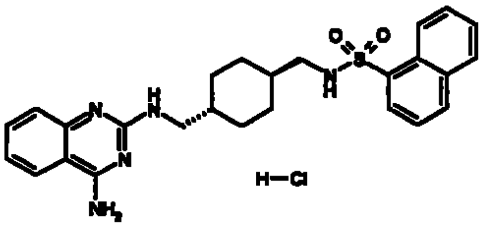
Hong Y, Gregor V, Ling AL, Tompkins EV, Porter J, Chou TS, Paderes G, Peng Z, Hagaman C, Anderes K, Luthin D, May J : Synthesis and biological evaluation of novel guanylurea compounds as potent NPY Y1 receptor antagonist Acs 1999 217 Anaheim MEDI 108

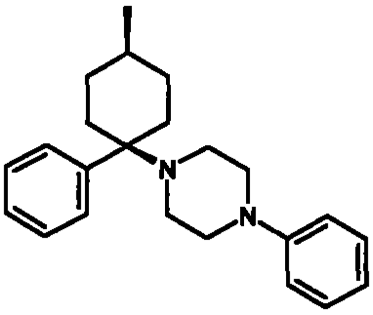
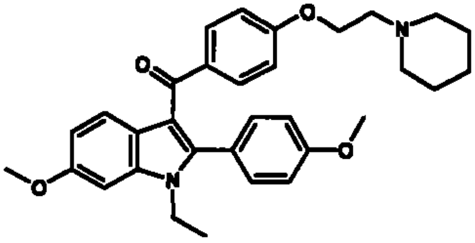
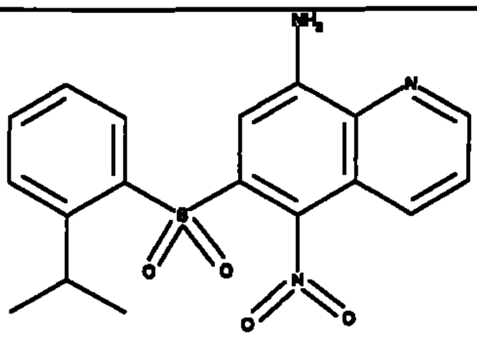
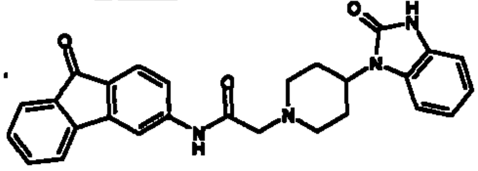
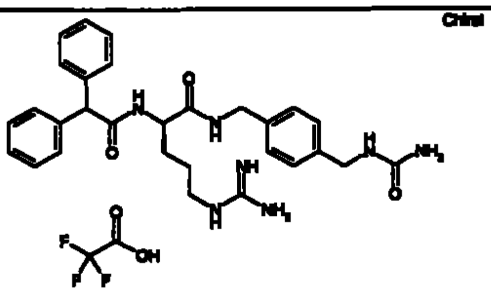
I:NPYs (in particular NPY antagonists) are disclosed in the following documents:

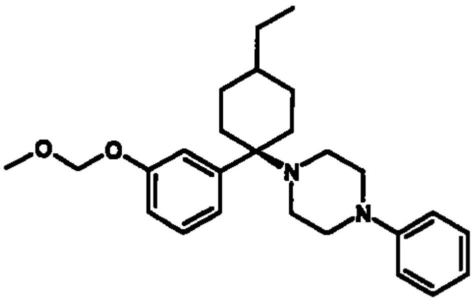
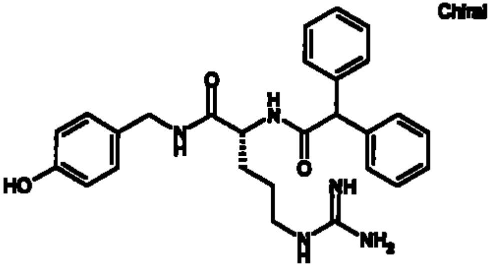
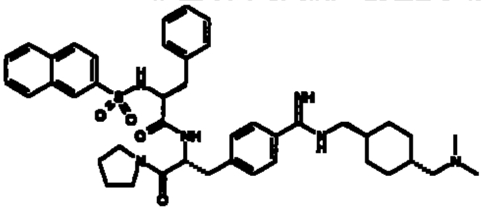
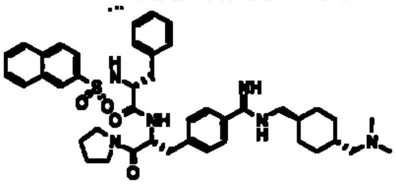
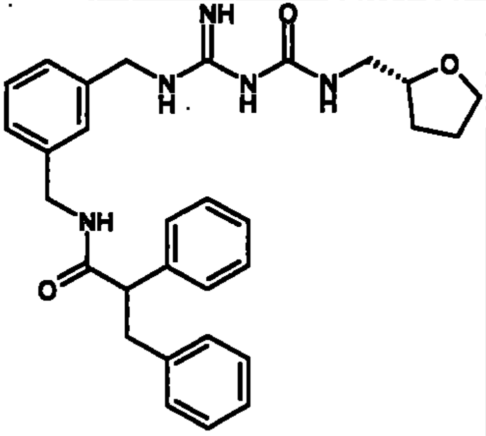
WO-98/07420
WO-94/00486
WO-96/22305
WO-97/20821
WO-97/20822
WO-96/14307
JP-07267988
WO-96/12489
US-5552422
WO-98/35957
WO-96/14307
WO-94/17035
EP-0614911

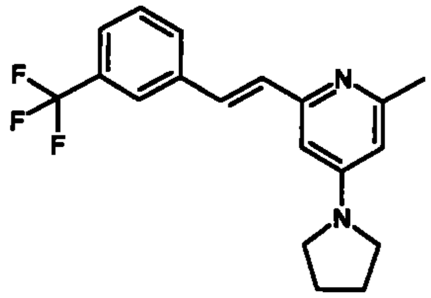
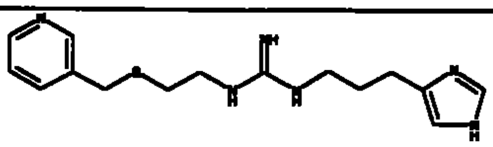
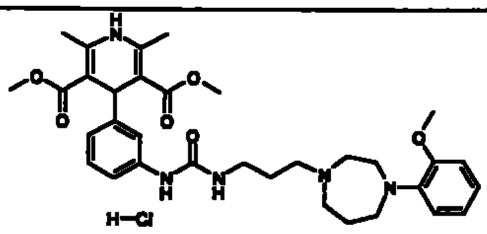
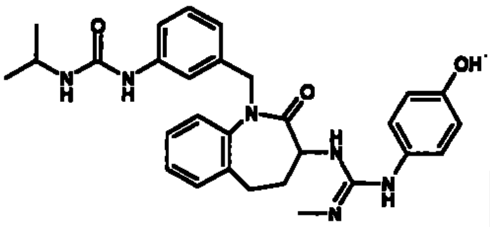
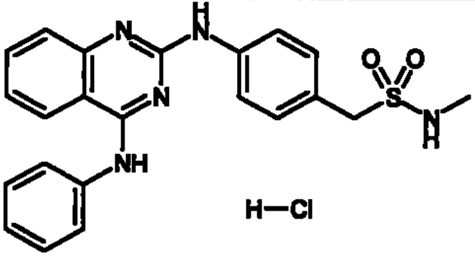
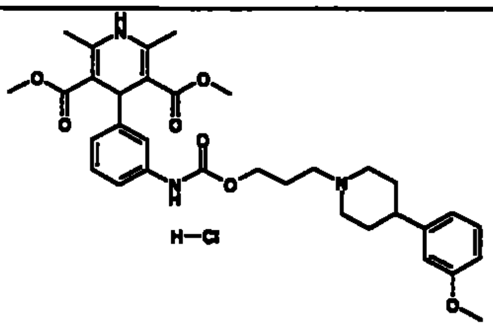
WO-98/40356
EP-0448765
EP-0747356
WO-98/35941
WO-97/46250
EP-0747357

Preferred examples of I:NPYs are selected from the following structures:

| **Compound** | **Structure** | **Mode of Action**<br>**References** |
|---|---|---|
| | | |
| F34 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/07420<br>Ref 3 |
| F35 |  | I:NPY<br>Ref 5 |
| F36 |  | I:NPY Y5<br>Ref 1, 4 |
| F37 | Ile - Cys- Pro-<br>Cys- Tyr- Arg- Leu- Arg- Tyr-<br>NH2 cyclic (2,2'), (4,4')- disulfide<br>dimer | I:NPY Y1<br>WO-94/00486<br>WO-96/22305<br>Ref 1,2, 23 |
| F38 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/20821<br>WO-97/20822<br>Ref 1, 3, 6, 7 |

| | | |
|---|---|---|
| F39 |  | I:NYP Y1<br>WO-96/14307<br>Ref 1, 8, 9, 10, 11 |
| F40 | | I:NPY Y1<br>JP-07267988<br>Ref 1 |
| F41 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/12489<br>Ref 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |
| F42 |  | I:NPY Y1<br>US-5552422<br>Ref 17, 18, 19, 20 |
| F43 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/35957<br>Ref 3 |
| F44 |  | I:NPY Y1<br>Ref 21, 22 |

| | | |
|---|---|---|
| F45 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref 3 |
| F46 | | I:NPY Y1<br>Ref 24 |
| F47 |  | I:NPY Y1<br>WO-94/17035<br>Ref 3, 17, 25, 26 |
| F47 | | I:NPY Y1<br>Ref 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |
| F48 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27 |
| F49 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27 |
| F50 |  | I:NPY Y1<br>Ref 28 |

| | | |
|---|---|---|
| F51 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/40356 |
| F52 |  | I:NPY<br>EP-0448765 |
| F53 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747356 |
| F54 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/35941 |
| F55 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/46250 |
| F56 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747357 |

VIP (vasoactive intestinal peptide)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is VIP or one of its associated receptors. Current classification/nomenclature refers to these as VPAC1, VPAC2 and PACAP.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for VIP and its receptors are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

We have shown that VPAC1and VPAC2 are present in human and rabbit vagina. PACAP was absent from both rabbit and human vagina.

VIP is the major endogenous neurotransmitter released during sexual arousal that is responsible for nerve-induced vaginal vasodilation of the vascular beds located in the vaginal wall. These vasodilatory effects are mediated by adenylate cyclase activation and cAMP production. Without wishing to be bound by theory, this effect may be mediated via VIP receptor subtypes $VPAC_1$, $VPAC_2$ or PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) receptors. $VPAC_2$ and PACAP receptors are not expressed outside of the CNS and the receptors despite being expressed in the pituitary, appears to have no widespread biological function.

The agent of the present invention could potentiate VIP and/or act as a VIP mimetic or analogue thereof. The agent would then potentiate and/or mimic the vasorelaxant effects of endogenous VIP released during sexual arousal. The agent may also have an additive effect on VIP-induced relaxations of vaginal smooth muscle. Clinically this will lead to FSAD treatment, though increased vaginal lubrication *via* vaginal wall engorgement and compliance. In this embodiment, the mimetic or analogue would not have, however, the adverse properties of VIP as discussed *supra*.

Background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning VIP has been extracted from that source.

"Vasoactive intestinal peptide (VIP), a 28-amino acid peptide originally isolated from porcine duodenum, is present not only in gastrointestinal tissues but also in neural tissues, possibly as a neurotransmitter, and exhibits a wide variety of biological actions. Because VIP shows similarities to glucagon, secretin and gastric inhibitory peptide (GIP), it has been considered a member of the glucagon-secretin family. The primary translation product of the mRNA encoding VIP (prepro-VIP) has a molecular weight of 20 daltons. By cloning the DNA sequence complementary to the mRNA coding for human VIP, Itoh et al. (1983) found that the VIP precursor contains not only VIP but also a novel peptide of 27 amino acids, designated PHM27, that has aminoterminal histidine and carboxyterminal methionine. It differs from PHI17 isolated from porcine intestine by 2 amino acids; PHI27, as its designation indicates, has carboxyterminal isoleucine. Linder et al. (1987) isolated the human gene for VIP and PHM27 and studied its expression in various tissues of the rat. Heinz-Erian et al. (1985) suggested that deficient innovation of sweat glands of cystic fibrosis patients by the VIP neuropeptide might be a basic mechanism for the decreased water content and relative impermeability of the epithelium to chloride and other ions that characterize cystic fibrosis. To test this hypothesis, Gozes et al. (1987) took the 'candidate gene' approach. Bodner et al. (1985) had shown that VIP and PHM-27 are encoded by adjacent exons. Gozes et al. (1987) used the PHM-27-encoding genomic fragment to detect the presence of the VIP gene at 6q21-qter. Thus, they eliminated a defective VIP gene as a candidate for the primary cause of cystic fibrosis (which is coded by chromosome 7). By in situ hybridization techniques, Gozes et al. (1987) assigned the VIP gene to 6q24. This placed VIP in the region of MYB (189990), which has been mapped to 6q22. Gozes et al. (1987) investigated a functional relationship between the 2 genes in neuronal tissue. They observed a sharp peak of MYB mRNA in the hippocampus of 3-day-old rats, preceding the peak of VIP mRNA that occurs in this area at 8 days of age. Omary and Kagnoff (1987) found nuclear receptors for VIP in a human colonic adenocarcinoma cell line. Gotoh et al. (1988) assigned VIP to chromosome 6 by spot blot hybridization of a molecularly cloned fragment of the gene to sorted chromosomes. The localization was refined to 6q26-q27 by in situ hybridization."

As indicated, background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning VIPR1 or VPAC1 has been extracted from that source.

"Vasoactive intestinal peptide (VIP; 192320) is an octacosameric neuroendocrine mediator found predominantly in cholinergic presynaptic neurons of the central nervous system and in peripheral peptidergic neurons innervating diverse tissues. Of the many neuroendocrine peptides with immunologic functions, VIP is distinguished by its capacity to affect both B and T cells directly. Distinct subsets of neural, respiratory, gastrointestinal, and immune cells bear specific high-affinity receptors for VIP, which are associated with a guanine nucleotide-binding (G) protein capable of activating adenylate cyclase. Libert et al. (1991) obtained 4 new receptors of the G protein-coupled receptor family by selective amplification and cloning from thyroid cDNA. One of these, termed RDC1, was identified as the VIP receptor by Sreedharan et al. (1991). Libert et al. (1991) mapped the VIPR gene to 2q37 by in situ hybridization. Later information made it doubtful that the gene mapped to 2q37 was in fact the VIP receptor gene (Vassart, 1992). The sequence that was designated GPRN1 by Sreedharan et al. (1991) and mapped to 2q37 was found not to bind VIP by Wenger (1993). Sreedharan et al. (1995) isolated an authentic type I VIP receptor gene and by fluorescence in situ hybridization localized it to the 3p22 band in a region associated with small-cell lung cancer. By interspecific backcross analysis, Hashimoto et al. (1999) mapped the mouse Vipr1 gene to the distal region of chromosome 9, a region that shows homology of synteny with human chromosome 3p. Sreedharan et al. (1993) cloned a human intestinal VIP receptor gene; the deduced amino acid sequence shares 84% identity with the rat lung VIP receptor. Couvineau et al. (1994) isolated 2 VIPR cDNA clones from a human jejunal epithelial cell cDNA library. One encodes a VIP receptor consisting of 460 amino acids and having 7 putative transmembrane domains, as do other G protein-coupled receptors. The other encodes a 495-amino acid VIP receptor-related protein exhibiting 100% homology with the functional VIP receptor over the 428 amino acids at the C-terminal region, but containing a completely divergent 67-amino acid N-terminal domain. When expressed in COS-7 cells, the second protein did not bind radioiodinated VIP, although it was normally addressed at the plasma membrane as assessed by immunofluorescence studies. The type I VIP receptor, also termed type II PACAP receptor (see 102981 for another type of PACAP receptor), was found by Sreedharan et al. (1995) to span approximately 22 kb and to be comprised of 13 exons (ranging from 42 to 1,400 bp) and 12 introns (ranging from 0.3 to 6.1 kb). Sreedharan et al. (1995) also characterized the promoter and the 5-prime flanking region of the gene."

As indicated, background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning VIPR2 or VPAC2 has been extracted from that source.

> "Vasoactive intestinal peptide (VIP; 192320) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP; 102980) are homologous peptides that function as neurotransmitters and neuroendocrine hormones. While the receptors for VIP and PACAP share homology, they differ in their substrate specificities and expression patterns. See VIPR1 (192321) and ADCYAP1R1(102981). Svoboda et al. (1994) performed low stringency PCR using primers based on sequences conserved among VIP receptors. They cloned the human VIP2 receptor gene from a lymphoblast cDNA library. This gene encoded a 438-amino acid polypeptide that shares 86% identity with the rat VIP2 receptor. They expressed the human VIP2 receptor in Chinese hamster ovary cells and found that it binds to PACAP-38, PACAP-27, VIP, and helodermin, and that binding of the receptor to any of these peptides activates adenylate cyclase. Peptide binding was found to be inhibited by GTP. Adamou et al. (1995) cloned the VIP2 receptor gene from a human placenta cDNA library. Northern blotting revealed that VIPR2 is expressed as 2 transcripts of 4.6 kb and 2.3 kb at high levels in skeletal muscle and at lower levels in heart, brain, placenta, and pancreas. Mackay et al. (1996) used fluorescence in situ hybridization to map the VIPR2 gene to human chromosome 7q36.3. Further mapping with cell lines derived from patients with holoprosencephaly type 3 (HPE3; 142945) revealed that the VIPR2 gene lies within the HPE3 minimal critical region. Mackay et al. (1996) stated that although VIPR2 may contribute to the HPE3 phenotype, it is not the sole factor responsible."

## AC (adenylate cyclase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is AC.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for AC are available in the literature.

To confirm that VIP induces vasorelaxation via elevation of intracellular cAMP levels and consequent activation of adenylate cyclase we have measured vaginal cAMP concentrations during VIP stimulation and used forskolin, an adenylate cyclase activator, to mimic the effects of activating the cAMP/adenylate cyclase pathway.

In these studies, we found that VIP treatment and forskolin treatment elevate intracellular concentrations cAMP in isolated vaginal tissue.

We also found that forskolin increases vaginal blood flow in an animal model of sexual arousal.

Additionally we found that forskolin induces relaxation in isolated vagina.

Background teachings on AC are presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning AC has been extracted from that source.

> "Adenylyl cyclase (EC 4.6.1.1 ) catalyzes the transformation of ATP into cyclic AMP. The enzymatic activity is under the control of several hormones, and different polypeptides participate in the transduction of the signal from the receptor to the catalytic moiety. Stimulatory or inhibitory receptors (Rs and Ri) interact with G proteins (Gs and Gi) that exhibit GTPase activity and they modulate the activity of the catalytic subunit of the adenylyl cyclase. Parma et al. (1991) cloned a cDNA corresponding to human brain adenylyl cyclase, symbolized by them as HBAC1. By in situ hybridization to metaphase chromosomal spreads using the human brain cDNA probe, Stengel et al. (1992) showed that the gene is located on 8q24.2. A highly homologous gene, ADCY2 (103071), was assigned to 5p15.3 by the same method."

## GENERAL RECOMBINANT DNA METHODOLOGY TECHNIQUES

Although in general the techniques mentioned herein are well known in the art, reference may be made in particular to Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989). and Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. PCR is described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188.

## SUMMARY

In summation, the present invention relates to:

1. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

2. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD.

3. A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

4. An assay method for identifying an agent that can be used to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: determining whether an agent can directly or indirectly potentiate cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In other embodiments, the present invention relates to:

5. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; wherein the agent is selected from any one or more of:

a cAMP mimetic
I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_{n}$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_{n}$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_{n}$
P$_{cAMP}$.

6. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is selected from any one or more of:

a cAMP mimetic
I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_{n}$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_{n}$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_{n}$
P$_{cAMP}$.

7. A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD, wherein the agent is optionally

admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient, wherein the agent is selected from any one or more of:

a cAMP mimetic
I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$
P$_{cAMP}$.

8. An assay method for identifying an agent that treat a female suffering from FSD, in particular FSAD, the assay method comprising determining whether or not a putative agent is capable of acting as any one or more of:

a cAMP mimetic
I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$
P$_{cAMP}$

wherein if the putative agent is capable of acting as any one or more of

a cAMP mimetic
I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$
P$_{cAMP}$

then the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In other embodiments, the present invention relates to:

9. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

10. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female.

11. A method of treating a female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the female so as to cause enhanced genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow.

## EXAMPLES

The present invention will now be described, by way of example only, in which reference is made to the following Figures:

Figure 1 which is a graph;
Figure 2 which is a graph;
Figure 3 which is a graph;
Figure 4 which is a graph;
Figure 5 which is a graph;
Figure 6 which is a graph;
Figure 7 which is a graph;
Figure 8 which is a graph;
Figure 9 which is a graph;
Figure 10 which is a graph; and
Figure 11 which is a graph.

In more detail:

Figure 1:- Electrical stimulation of the pelvic nerve induces a frequency-dependent increase in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Increasing the stimulation frequency induces larger increases in blood flow. Changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 2:- Vasoactive intestinal peptide (VIP)-induces increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Figure 2a illustrates how vaginal blood flow is increased in a concentration dependent manner by infusions of VIP (intravenous bolus). Figure 2b demonstrates that 2 repetitive infusions of VIP produce similar increases in blood flow. Note the duration of the response is also similar. All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 3:- Vasoactive intestinal peptide (VIP) reduces the mean arterial blood pressure in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. This graph illustrates the *typical* effects of the vasoactive agents and stimulation parameters used to investigate vagina blood flow on mean arterial pressure in an anaesthetised rabbit. These observed effects are typical of the trends seen in all animals tested. VIP induced a significant depression of mean arterial pressure whereas pelvic nerve

stimulation, control infusions of Hepsaline or inhibitors of $PDE_{cAMP}$ or NEP have no effect on blood pressure. Note, the reduction in blood pressure associated with VIP infusions is also associated with a large increase in heart rate.

Figure 4:- Activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway mimics VIP mediated vasorelaxation and smooth muscle relaxation in vaginal tissue. Figure 4a illustrates that an infusion of forskolin (40nmol/kg *iv* bolus, a cAMPmimetic) induces significant increases in vaginal blood flow. Note the amplitude and duration of the response is similar to that induced by VIP (20.0µg/kg, *iv* bolus). Interestingly, the effects on blood flow have a longer duration of action on the external vaginal wall. All changes were monitored using laser Doppler technologies. Figure 4b demonstrates that both VIP (0.1µM) and forskolin (10µM) significantly elevate intracellular concentrations of cAMP above basal levels in the rabbit vagina. Figure 4c shows that forskolin induces potent relaxations of precontracted (1µM phenylephrine) rabbit vaginal strips with an $IC_{50}$~300nM. All changes were quantified using *in vivo* laser Doppler technologies, biochemical cAMP enzyme immunoassay or by *in vitro* tissue relaxation.

Figure 5:- Infusion of VIP increases clitoral blood flow and activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway mimics VIP mediated clitoral vasorelaxation in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Infusion of VIP (60-200µg/kg) induces a concentration dependant increase in clitoral blood flow. A 115% increase in clitoral blood flow was observed after an iv infusion of 200µg/kg VIP. The effects of VIP on clitoral blood flow can be mimicked by an infusion of a cAMP mimetic forskolin (FSK, 40nmol/kg *iv* bolus). A 156% increase in clitoral blood flow was observed after an iv infusion of 40nmol/kg forskolin. All increases were significantly elevated from control infusions (Hepsaline). Note the amplitude of the response is similar to that induced by VIP (200µg/kg, *iv* bolus) and comparable to those observed on vaginal blood flow in Figs 2 and 4. All changes were quantified using *in vivo* laser Doppler technologies and were significantly increased when compared to vehicle infusions (Hepsaline).

Figure 6:- A selective inhibitor of NEP EC 3.4.24.11 enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive PNS at 15 minute intervals induces reproducible increases in vaginal blood flow (White bar). Administration of a NEP inhibitor (Grey bar) enhanced the peak increase in vaginal blood flow induced by submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz) compared to increases observed during time

matched control stimulations or vehicle controls (Hatched bar). The following dose dependant enhancements were observed - 0.3mg/kg iv induced a 40% increase and 1.0mg/kg iv induced a 91% increase (mean n=3). The NEP inhibitor had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow (Data not shown). All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 7:- Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive infusions of VIP at 30 minute intervals induce reproducible increases in vaginal blood flow (See figure 2b). An NEP inhibitor both potentiates the amplitude and prolongs the duration of enhanced blood flow when these increases are induced by submaximal doses of VIP e.g. 6.0µg/kg. At doses of VIP which induce maximal increases in vaginal blood flow eg 60µg/kg, NEP inhibitors only potentiate the duration of enhanced vaginal blood flow. VIP-induced increase in the presence of a NEP inhibitor are shown as closed triangles whereas control VIP responses are shown as open triangles. A control infusion of Hepsaline has no effect on the amplitude of the responses. All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 8:- A selective inhibitor of $PDE_{cAMP}$ type 2 enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive PNS at 15 minute intervals induces reproducible increases in vaginal blood flow (White squares). Administration of a $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor enhanced the peak increase in vaginal blood flow induced by submaximal stimulation frequencies (Black squares; at 4Hz) compared to increases observed during time matched control stimulations (Open squares). An infusion of the PDE2 inhibitor (500µg/kg) induced a 86.8±21.9% enhancement in vaginal blood flow (mean±sem n=2). All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 9:- Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ type 2 enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive infusions of VIP at 30 minute intervals induce reproducible increases in vaginal blood flow (See figure 2b). A selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor (25µg/kg *iv* bolus) potentiates the duration of enhanced vaginal blood flow induced by VIP (60µg/kg *iv* bolus). VIP-induced increases in the presence of a $PDE_{cAMP}$ inhibitor are shown as closed triangles whereas control VIP responses are shown as open triangles. A

control infusion of Hepsaline had no effect on the amplitude of the responses. All changes were monitored using Laser Doppler technologies.

Figure 10:- A selective antagonist of NPY Y1 receptors enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive PNS at 15 minute intervals induces reproducible increases in vaginal blood flow (data not shown). Administration of a NPY Y1 antagonist (Grey bar) enhanced the peak increase in vaginal blood flow induced by submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz) compared to increases observed during time matched control stimulations or in vehicle controls (Hatched bar). The following dose dependant enhancements were observed - 0.01mg/kg iv induced a 15.8±19.6% increase; 0.03mg/kg iv induced a 35.1±17.17% increase; 0.10mg/kg iv induced a 60.1±16.9% increase and 0.3mg/kg iv induced a 91.9±27.4% increase (mean±sem n=3). The NPY Y1 antagonist had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow (Data not shown). All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 11 provides a summary graph for some of the data provided herein showing that the agents of the present invention are very useful in increasing vaginal blood flow by potentiating endogenous cAMP levels.

## AN ASSAY FOR MEASURING cAMP ACTIVITY/LEVELS

Measurement of cAMP from vaginal tissue samples using a Biotrak cAMP Enzymeimmunoassay (EIA) kit (Amersham Life Sciences RPN 225).

cAMP levels are measured by EIA in vaginal tissue samples. The EIA is based on competition between unlabelled cAMP and a fixed quantity of peroxidase labelled cAMP for a limited amount of cAMP specific antibody.

## 1. MATERIALS

All materials are supplied by Amersham Life Science cAMP EIA kit (RPN 225) unless otherwise stated.

1.1 Microtitre plate - 96 well plate coated with donkey anti-rabbit IgG.

1.2 Assay buffer - 0.05M sodium acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. The contents of the bottle are transferred to a graduated cylinder using 3x15ml distilled water washes. The final volume is then adjusted to 500ml.

1.3 cAMP standard (for acetylation method). cAMP at 10.24pmol/ml in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Standard is dissolved in 2.5ml of assay buffer for use.

1.4 Antiserum. Anti-cAMP antibody in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Prior to use, antibody is diluted with 11ml assay buffer and mixed by gentle inversion to dissolve contents.

1.5 cAMP conjugate. cAMP horseradish peroxidase in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Prior to use, solution is diluted with 11ml assay buffer and mixed by gentle inversion to dissolve contents.

1.6 Wash buffer. 0.01M phosphate buffer pH7.5 containing 0.05% (v/v) Tween™ 20 upon reconstitution. The contents of the bottle are transferred to a graduated cylinder using 3x15ml distilled water washes. The final volume is then adjusted to 500ml.

1.7 TMB substrate. 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine (TMB)/ hydrogen peroxide, in 20% (v/v) dimethylformamide.
Ready for use.

1.8 Acetylation reagent. 2ml acetic anhydride, 4ml triethylamine, prepared as required.

1.9 Sulphuric acid (1M). 1M Sulphuric acid is prepared from an 18M stock (BDH). 1.11ml of acid is added to 18.8ml of distilled water.

## 2. SPECIFIC EQUIPMENT

2.1 Disposable 5ml glass test tubes

2.2 Spectrophotometric plate reader (Spectra max 190)

2.3 Microtitre plate shaker (Luckham R100)

## 3. METHODS

- Tissue sample preparation. The tissues were treated with the relevant pretreatment in 5ml samples of physiological salt solution eg agonists, cAMPmimetics etc. After treatment the samples were snap frozen in liquid nitrogen and then smashed using a hammer. The powder was scraped into a centrifuge tube and 1ml of 0.5M ice cold perchloric acid (PCA) was added. The sample was vortex mixed and left on ice for 1hr.

- cAMP extraction from tissue samples. The samples were centrifuged at 10000g for 5 min at 4°C. The supernatant was removed and placed in other centrifuge tubes. The pellet was keep for protein analysis at -80°C. The supernatant samples were then neutralised to pH~6 using $K_3PO_4$. Centrifuged at 10000g for 5 min at 4°C. Recover supernatant and wash 4 times with 5 volumes (5ml) of water saturated diethyl ether. The upper ether layer should be discarded after each wash. Transfer aqueous to into a short thin glass tube and dry under a steam of nitrogen at 60°C. Dissolve dried extract in 1ml of assay buffer and store in refrigerator until required (or can be frozen).
- Stock reagents are equilibrated to room temperature and working solutions then prepared
- cAMP standards are prepared in glass tubes labelled 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, and 512fmol. This is achieved by adding 1ml of assay buffer to all tubes except the 512fmol standard. 1ml of acetylation standard (10.24pmol/ml) is then added to the two top standards (256, and 512fmol). The 256fmol standard is vortexed and 1ml transferred to the 128fmol standard. his is continued until the 2fmol standard where 1ml of solution is disposed of. A zero standard tube is set up containing 1ml of assay buffer.
- Tissue extract samples are thawed on ice (if necessary) and diluted 1 in 100 (10µl sample to 990µl assay buffer) in labelled glass tubes.
- The cAMP in all standards and samples is acetylated by the addition of 100µl of acetylation reagent in a fume hood which is added down the side of the tube before immediately vortexing.
- 50µl of all standards and samples are added to the appropriate wells of the 96 well plate, and 150µl of assay buffer is added to non specific binding (NSB) wells.
- 100µl of antiserum is added to all wells except blanks (B) and NSB before incubating for 2 hours at 3-5°C.
- After incubation, 100µl of cAMP-peroxidase conjugate is added to all wells except B before a further 1 hour incubation at 3-5°C.
- Plates are emptied by turning them upside down and blotting onto absorbent paper before washing each well four times with 400µl of wash buffer. After each wash plates are re-blotted to ensure any residual wash buffer is removed. 200µl TMB is then immediately dispensed into all wells.

- Plates are put on a plate shaker for 30 minutes at room temperature before the addition of 100µl of 1M sulphuric acid into all wells. The optical density is read on Spectra max 190 at 450nm within 30 minutes.

## 4. STANDARDS

With each assay the following standard tubes are set up:-

### 4.1 Spiking a standard in assay buffer

A known amount of cAMP is spiked into assay buffer to determine the efficiency of the assay. 70pmol/ml of cAMP is added to assay buffer which is equivalent to 35fmol/well in the assay, which is in the middle of the dose response curve.

To make up 1ml of standard:- 68.4µl 521fmol/well standard
931.6µl Assay buffer

### 4. Effects of compounds on plate

Standards are set up to determine whether the compound used in the functionalstudies has any effect on the 96 well plate or affects the binding of cAMP. These include:-

- Spiking the compound into assay buffer alone to assess the effects of the compound directly on the plate.
- Spiking the compound into plasma containing basal levels of cAMP to assess the effects of the compound on the binding of cAMP to the plate.

5nM concentrations of compound are spiked into each standard. 5nM is chosen because total drug levels at the end of infusion have in the past been approximately 150-300nM. Samples are diluted 1:100 before being assayed, therefore 5nM allows for any larger than expected total drug concentrations at the end of infusion.

## 5. CALCULATIONS

The Spectra max plate reader reads the optical density (OD) at 450nm.

The standard curve is generated by plotting the %B/Bo (y axis) against cAMP fmol/well (x axis) on Spectra max.

%B/B0 (% bound) for each sample and standard is calculated as follows:-
Bo = zero standard (see methods 3.2)

$$\%B/Bo = \frac{(\text{standard or sample OD-NSB OD})}{(\text{Bo OD-NSB OD})} \times 100$$

The fmol/well volume can then be read directly from the standard curve for each sample. Values are then converted to pmol/ml before taking the mean of each pair of samples.

Conversion of values from fmol/well to pmol/ml:-

fmol to pmol = divide by 1000
Volume in well = 50µl .... So (x1000)
50
Sample is diluted 1/100, so overall = 1 x 1000/1000 x 100/50 = 2

So all fmol/well values are multiplied by 2 to give pmol/ml

## ANIMAL TEST MODEL

## POTENTIATING THE EFFECTS OF CYCLIC ADENOSINE-3',5'-MONOPHOSPHATE (cAMP) RESULTS IN INCREASES IN VAGINAL BLOOD FLOW IN THE ANAESTHETISED RABBIT MODEL OF SEXUAL AROUSAL

### 1.0 Aims

1. To develop and validate an animal model of female sexual arousal.
2. To identify the mechanism(s) responsible for the regulation of genital blood flow in the anaesthetised rabbit.
3. To identify potential approaches for enhancement of vaginal and clitoral blood flow.
4. To investigate the mechanism(s) that underlie relaxation of vaginal smooth muscle and to identify potential approaches for enhancement of vaginal relaxation.

### 2.0 Introduction

The normal sexual arousal response consists of a number of physiological responses that are observed during sexual excitement. These changes such as vaginal, labial and clitoral engorgement result from increases in genital blood flow. Engorgement leads to increased vaginal lubrication via plasma transudation, increased vaginal compliance (relaxation of vaginal smooth muscle) and increases in vaginal and clitoral sensitivity.

Female sexual arousal disorder (FSAD) is a highly prevalent sexual disorder affecting up to 40% of pre-, peri- and postmenopausal (±HRT) women. The primary consequence of FSAD is reduced genital engorgement or swelling which manifests itself as a lack of vaginal lubrication and a lack of pleasurable genital sensation. Secondary consequences include reduced sexual desire, pain during intercourse and difficulty in achieving orgasm. The most common cause of FSAD is decreased genital blood flow resulting in reduced vaginal, labial and clitoral engorgement. (Park, 1997; Goldstein, 1998; Berman, 1999a, Werbin, 1999).

As explained herein, the present invention provides a means for restoring or potentiating the normal sexual arousal response in women suffering from FSAD, by enhancing genital blood flow.

In our studies, we have identified cAMP (cyclic adenosine-3',5'-monophosphate) as the mediator of vaginal vasorelaxation using laser Doppler technology to measure small changes in genital blood flow. This has involved developing an animal model of sexual arousal and demonstrating that the data reflects the physiological changes observed during female sexual arousal. The model has then been used to identify and validate mechanisms that enhance genital blood flow eg. direct or indirect potentiation of cAMP-mediated vasorelaxation.

## 3.0 Methods

### *3.1 Anaesthetic Protocol*

Female New Zealand rabbits (~2.5kg) were pre-medicated with a combination of Medetomidine (Domitor®) 0.5ml/kg *i.m.*, and Ketamine (Vetalar®) 0.25ml/kg *i.m.* whilst maintaining oxygen intake via a face mask. The rabbits were tracheotomised using a Portex™ uncuffed endotracheal tube 3 ID., connected to ventilator and maintained at a ventilation rate of 30-40 breaths per minute, with an approximate tidal volume of 18-20 ml, and a maximum airway pressure of 10 cm $H_2O$. Anaesthesia was then switched to Isoflurane and ventilation continued with $O_2$ at 2l/min. The right marginal ear vein was cannulated using a 23G or 24G catheter, and Lactated Ringer solution perfused at 0.5ml/min. The rabbit was maintained at 3% Isoflurane during invasive surgery, dropping to 2% for maintenance anaesthesia.

### *3.2 Cannulation of Vessels*

The left groin area of the rabbit was shaved and a vertical incision was made approximately 5cm in length along the thigh. The femoral vein and artery were exposed, isolated and then cannulated with a PVC catheter (17G) for the infusion of drugs and compounds. Cannulation was repeated for the femoral artery, inserting the catheter to a depth of 10cm to ensure that the catheter reached the abdominal aorta. This arterial catheter was linked to a Gould system to record blood pressure. Samples for blood gas analysis were also taken via the arterial catheter. Systolic and diastolic pressures were measured, and the mean arterial pressure calculated using the formula (diastolic x2 + systolic) ÷3. Heart rate was measured via the pulse oxymeter and *Po-ne-mah* data acquisition software system (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems Inc).

### 3.3 *Stimulation of the Pelvic Nerve*

A ventral midline incision was made into the abdominal cavity. The incision was about 5cm in length just above the pubis. The fat and muscle was *bluntly* dissected away to reveal the hypogastric nerve which runs down the body cavity. It was essential to keep close to the side curve of the pubis wall in order to avoid damaging the femoral vein and artery which lie above the pubis. The sciatic and pelvic nerves lie deeper and were located after further dissection on the dorsal side of the rabbit. Once the sciatic nerve is identified, the pelvic nerve was easily located. The term *pelvic nerve* is loosely applied; anatomy books on the subject fail to identify the nerves in sufficient detail. However, stimulation of the nerve causes an increase in vaginal and clitoral blood flow, and innervation of the pelvic region. The pelvic nerve was freed away from surrounding tissue and a *Harvard* bipolar stimulating electrode was placed around the nerve. The nerve was slightly lifted to give some tension, then the electrode was secured in position. Approximately 1ml of light paraffin oil was placed around the nerve and electrode. This acts as a protective lubricant to the nerve and prevents blood contamination of the electrode. The electrode was connected to a *Grass* S88 Stimulator. The pelvic nerve was stimulated using the following parameters:- 5V, pulse width 0.5ms, duration of stimulus 10 seconds and a frequency range of 2 to 16Hz. Reproducible responses were obtained when the nerve was stimulated every 15-20 minutes.

A frequency response curve was determined at the start of each experiment in order to determine the optimum frequency to use as a sub-maximal response, normally 4Hz. The compound(s) to be tested were infused, via the femoral vein, using a *Harvard* 22 infusion pump allowing a continuous 15 minute stimulation cycle.

### *3.4 Positioning of the Laser Doppler Probes*

A ventral midline incision was made, at the caudal end of the pubis, to expose the pubic area. Connective tissue was removed to expose the tunica of the clitoris, ensuring that the wall was free from small blood vessels. The external vaginal wall was also exposed by removing any connective tissue. One laser Doppler flow probe was inserted 3cm into the vagina, so that half the probe shaft was still visible. A second probe was positioned so that it lay just above the external clitoral wall. The position of these probes was then adjusted until a signal was obtained. A second probe was placed just above the surface of a blood vessel on the external vaginal wall. Both probes were clamped in position.

Vaginal and clitoral blood flow was recorded either as numbers directly from the Flowmeter using *Po-ne-mah* data acquisition software (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems Inc), or indirectly from Gould chart recorder trace. Calibration was set at the beginning of the experiment (0-125ml/min/100g tissue).

### *3.5 Infusion of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)*

The doses of VIP (Bachem, H-3775) infused were 2.0, 6.0, 20.0, 60.0 µg/kg *i.v.* and were infused in a volume of 0.5 ml of saline. VIP was infused using a Harvard 22 pump, infusing at 500µl/min via a 3-way tap into the femoral vein. After VIP infusion, the catheter was flushed with heparinised saline (Hepsaline) so that no VIP was left in the catheter.

For experiments using VIP infusions, there was a need for an initial sensitising dose response curve (2-60µg/kg), in order that reproducible responses could be obtained. An initial infusion of Hepsaline (50UI/ml) was infused to act as a negative control.

### *3.6 Infusion of Inhibitors*

NEP (Neutral Endopeptidase EC3.4.24.11) inhibitors, phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors and NPY Y1 antagonists were made up in saline or 5% glucose solution (200µl 50% glucose in 1.8ml water for injection). $PDE_{cAMP}$ inhibitors were dissolved in a 40% ethanol solution (200µl 50% glucose in 1.8ml water/ethanol for injection). The inhibitors and vehicle controls were infused at the same rate as VIP. NEP inhibitors were left for 30 minutes prior to a VIP dose response curve, whilst NEP inhibitors, NPY Y1 receptor antagonists and $PDE_{cAMP}$ inhibitors were left for 15 minutes prior to pelvic nerve stimulation.

### *3.7 Measurement of smooth muscle relaxation in isolated rabbit vagina*

3.7 (a). Rabbit vagina *in vitro* preparation:- Female New Zealand white rabbits (2.0 - 3.0 kg) were killed by cervical dislocation. The abdominal cavity was opened and the vagina excised. Tissue strips were mounted longitudinally in Wesley Co. 5ml silanised organ chambers with braided silk sutures (6/0 gauge) at an initial resting tension of 1.5g in Krebs bicarbonate buffer maintained at 37°C and gassed with $95\%O_2/5\%CO_2$. The upper ligature of each tissue strip was attached to a 10g capacity force-displacement transducer and changes in isometric force were measured and recorded using a DART *in vitro* data capture system. Tissues were allowed to equilibrate for 1.5 hours and were regularly washed with Krebs.

3.7 (b). Vasoactive intestinal peptide-induced relaxation of rabbit vagina:- Each tissue was contracted using 1μM bath concentration of phenylephrine. When the contractile response reached a stable plateau (~15 minutes), VIP was cumulatively added to the organ chamber at log units to produce concentrations from 0.1 - 100nM. The relaxation responses were measured 5 minutes after the addition of each concentration of VIP; maximum relaxation was achieved by this time. Tissues then received either a test agent (eg NEP or PDE inhibitor) or DMSO vehicle (time matched control).

3.7 (c). Analysis of data for VIP relaxation experiments:- For each VIP concentration relaxation-response curve, the relaxation responses induced by VIP were expressed as a percentage of the maximum phenylephrine induced contraction. These values were then plotted against log VIP concentration and sigmoidal curves were fitted. For the purpose of curve fitting the minimum relaxation response was constrained to 0 % and the maximum relaxation response was allowed to free fit. The concentration of VIP required to produce 50 % relaxation of the phenylephrine contraction ($EC_{50\ PE}$) was determined.

3.7 (d). Electrical field stimulated relaxation of rabbit vagina:- Rabbit vaginal strips were prepared as described in Section 3.7 (a). The tissue strips were mounted between two platinum electrodes placed at the top and bottom of the organ chamber approximately 4cm apart. Each tissue was contracted using 1μM bath concentration of phenylephrine. When the contractile response reached a stable plateau (15 minutes), the tissues underwent a pre-treatment electrical field stimulated (EFS) induced relaxation curve. This was performed between 40 - 60 volts using sequential frequencies of 2, 4, 8 and 16 Hz delivered as 10 second trains of 0.5 milli second pulse width. The tissues were allowed to return to base line pre-contractile tension between each frequency (5 minutes) and the size of the relaxation response recorded.

After completion of the pre-treatment EFS response curve, all tissues were washed for 15 minutes, allowing the tissues to return to the baseline tension. Tissues then received either a test agent (eg NEP or PDE inhibitor, nitric oxide synthase [NOS] inhibitor) or DMSO vehicle (time matched control). Tissues were re-contracted with phenylephrine (1μM) 15 minutes after the addition of compound or vehicle and an EFS-induced relaxation response curve determined as described above.

For EFS experiments the Krebs was supplemented with atropine (10μM) and guanethidine (150μM) to abolish any cholinergic or adrenergic neuronal innervations of the vagina.

### *3.8 Measurement of cAMP levels in isolated rabbit vagina*

Measurement of cAMP concentrations were made from vaginal tissue extracts using a Biotrak cAMP Enzyme immunoassay (EIA) kit (Amersham Life Sciences RPN 225). Isolated vaginal tissue samples were treated with test agents (eg forskolin or VIP). After 5 minutes the samples were snap frozen using liquid nitrogen, homogenised and cAMP was extracted. cAMP levels are measured by EIA. The EIA is based on competition between unlabelled cAMP and a fixed quantity of peroxidase labelled cAMP for a limited amount of cAMP specific antibody.

### *3.9 Measurement of phosphodiesterase (PDE) activity in isolated rabbit vagina*

Human vaginal wall cytosol extracts were obtained from ABS Inc., Delaware (Age of donors 41 and 60 years old). The PDE isoenzymes were separated by Mono-Q anion exchange chromatography and characterised based upon their substrate selectivity, sensitivity to allosteric modulators and *selective* inhibitors. Western analysis using specific PDE isoenzyme antibodies was also performed to detect PDE expression in the human vagina.

All data are reported as mean ± s.e.m.. Significant changes were identified using Student's t-tests.

## 4.0 Results and Discussion

### *4.1 Animal model of sexual arousal*

In our studies, we have developed a robust reproducible model of the physiology of sexual arousal. Using this anaesthetised rabbit model, we are capable of measuring small changes in genital blood flow using Laser Doppler technology. Stimulation of the pelvic nerve is used to simulate the neuronal effects of sexual arousal.

We found that stimulation of the pelvic nerve induces frequency-dependent increases in vaginal and clitoral blood flow (See Figure 1). The increases in vaginal blood flow are significant when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall. Stimulation of the pelvic nerve at 2Hz induced a mean maximum vaginal blood flow elevation of 10.3±1.8, at 4Hz 20.0±4.6, 8Hz 36.3±4.8 and 16Hz 46.6+4.7 ml/min/100g tissue (n=4); 15-20V, 0.5ms, 10s) and increases in clitoral blood flow of 14.7±3.6 at 2Hz, 29.4±1.4 at 4Hz and 69.7±2.1 at 8Hz. These values are of similar amplitude to those previously observed in human studies and animal models of arousal (Berman, 1999a; Park, 1997).

We found that submaximal stimulation of the pelvic nerve results in reproducible increases in genital blood flow (eg stimulating 4Hz every 15 minutes gave a mean increase of in vaginal blood flow of 8.50±0.10ml/min/100g tissue n=8 and a mean increase in clitoral blood flow of 13.65±0.86ml/min/100g tissue n=11). This reproducibility is maintained for up to 5 hours. We can use the reproducibility of these responses to investigate a.) the identity of endogenous vasoactive agents/mechanisms which mediate genital engorgement, and b.) the influence of drugs which may be efficacious in enhancing vaginal and/or clitoral blood flow.

We found that there are no adverse cardiovascular effects associated with pelvic nerve stimulation in the anaesthetised rabbit (See Figure 3).

Genital blood flow is increased during sexual arousal (Berman, 1999) via an increased arterial blood supply - the vaginal artery, the vaginal branch of the uterine artery, the internal pudendal artery and the middle branches of the middle rectal artery are all involved in supplying blood to the vagina and clitoris. The pelvic nerve which originates from S2/S4 spinal regions, innervates the female genitalia and has branches terminating in the lower vagina, clitoris and related blood vessels. By stimulating the pelvic nerve we can simulate the blood flow effects observed during sexual arousal i.e. an increase in arterial genital blood flow. Interestingly, the increased arterial blood flow is not mirrored by venous drainage allowing the capillary networks to become engorged with blood. Vaginal engorgement leads to vaginal lubrication, via increased plasma transudation and this is one of the first pelvic responses observed during sexual stimulation. The neurotransmitters that are released upon pelvic nerve stimulation or during sexual arousal are currently unidentified. Nerves containing neuropeptides and other neurotransmitter candidates that innervate the vasculature and microvasculature of the vagina and clitoris have been identified immunohistochemically. These studies indicate that calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NPY), nitric oxide synthase (NOS), substance P and vasoactive intestinal peptide (VIP) are all present in the nerves that innervate the human vagina and clitoris (Hoyle, 1996; Burnett, 1997; Hauser-Kronberger, 1999).

### 4.2 *Validation of the anaesthetised rabbit model of sexual arousal*

In order to translate blood flow data generated using this model to those observed in a human model of sexual arousal, we directly compared our data with vaginal blood flow and cardiovascular data generated in pre-clinical studies.

We found that VIP infusion has the following effects in rabbit model of sexual arousal:-

- Exogenous VIP (*iv* bolus) induces significant concentration-dependent increases in vaginal blood flow (See Figure 2a). These increases are significantly elevated above basal blood flow values when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall. Vaginal blood flow was significantly increased by 24.7±3.6ml/min/100g tissue with an intravenous administration of VIP (60µg/kg). The blood flow remained elevated above basal for about 11 minutes post-infusion. Lower doses induced smaller increases eg 60.3µg/kg, elevated blood flow by 7.5±1.3ml/min/100g tissue and blood flow was elevated for 7 minutes post-infusion.

- Repetitive infusions of similar doses of VIP (*iv* at 30 minute intervals) induce significant reproducible increases in vaginal blood flow (See Figure 2b).

- VIP (*iv*) significantly increases heart rate and decreases mean arterial blood pressure (See Figure 3). At 6.0µg/kg VIP (*iv*) caused significant reduction in mean arterial blood pressure of 13.2±0.7mm Hg and a significant increase in heart rate of 16±4 beats per minute.

This animal model directly reflects the clinical data observed upon infusion of VIP into health volunteers ie increased vaginal blood flow, suppressed blood pressure and elevated heart rate. Therefore this model can be used to investigate the mechanism(s) that underlie physiological changes that occur during sexual arousal and additionally to validate novel approaches for the enhancement of vaginal blood flow and hence treatment of FSAD.

### *4.3 VIP-induces changes in vaginal blood flow via stimulation of the cAMP/adenylate cyclase pathway*

Ottesen and co-workers demonstrated that VIP induces increases in vaginal blood flow and lubrication in healthy volunteers. However the mechanism by which VIP exerts it's effects are unclear. In the literature, there are plenty of examples of VIP signalling through different second messenger systems including cGMP/guanylate cyclase (Ashur-Fabian, 1999), carbon monoxide/heme oxygenase (Fan, 1998) and cAMP/adenylate cyclase (Schoeffter, 1985; Gu, 1992; Foda, 1995). This is exemplified by a recent report which describes how the relaxant effects of VIP in the uterine artery can be explained by the release of nitric oxide (Jovanovic, 1998).

Interestingly there is also evidence for VIP modulating NO/cGMP in male urogenital function (Kim, 1994) and there is direct evidence that treatment of human vaginal smooth muscles cell cultures, with VIP (0.5μM) fails to elevate cAMP levels (Traish, 1999 *ibid*).

In this study we have shown that VIP induces vasorelaxation via elevation of intracellular cAMP levels. By conducting a series of functional experiments we have measured blood flow and smooth muscle relaxation in addition to biochemically measuring intracellular cAMP concentrations. We have used forskolin, an activator of adenylate cyclase or cAMPmimetic, to mimic the effects of activating the cAMP/adenylate cyclase pathway. VIP and forskolin have identical effects on the physiological arousal effects on vaginal blood flow and relaxation.

VIP (20μg/kg) and forskolin (40nmol/kg) induces significant increases in vaginal blood flow 13.2 and 12.7ml/min/100mg tissue respectively (See figures 2a and 4a). These changes in amplitude induced by VIP and forskolin were not significantly different. These increases are significantly elevated above basal blood flow values when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall.

VIP (0.1μM) and forskolin (10μM) both significantly increased intracellular concentrations cAMP above basal levels in isolated vaginal tissue (See Figure 4b).

VIP (0.1μM) and forskolin (10μM) elevate basal concentrations from 276nM by 156% and 238% respectively. The differences in these percentages reflects the difference in concentrations of VIP and forskolin used eg VIP at a concentration of 0.1μM relaxes precontracted isolated vagina by circa 80% where as 10μM forskolin is sufficient to completely relax isolated tissue.

Additionally we showed that VIP and forskolin induces relaxation in isolated vaginal tissue with $EC_{50}$ values of 18.8±0.6nM and 320±20nM respectively (See Figure 4c).

These data establish that VIP induces vaginal vasorelaxation via the cAMP/adenylate cyclase pathway, hence this model can be used to investigate whether pelvic nerve stimulation, i.e. sexual arousal, leads to the release of VIP/activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway. In addition, approaches to enhance vaginal blood flow during sexual arousal, eg by directly or indirectly enhancing cAMP signalling, can also be investigated.

## *4.4 cAMP is the mediator of vaginal vasorelaxation*

The neurotransmitter and second messenger candidates responsible for increases in vaginal blood flow during sexual arousal are currently unidentified. Todate, workers have focused on the nitric oxide (NO)/cGMP pathway. In accordance with the present invention, we have demonstrated that:- 1.) the cAMP/adenylate cyclase pathway mediates VIP-induced increases in vaginal blood flow; 2.) VIP is the endogenous neurotransmitter released during sexual arousal and 3.) endogenously released VIP induces it's vasorelaxant effects via elevation of cAMP.

The neurotransmitter responsible for vaginal wall relaxation is currently unidentified. We have shown that VIP is the neurotransmitter release upon stimulation of the pelvic nerve and that cAMP mediates the VIP-mediated vasorelaxation. Agents that prevent the metabolism of VIP or directly enhance cAMP signalling enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow eg NEP inhibitors or $PDE_{cAMP}$ inhibitors respectively (see following sections).

In our studies, we have found that we believe that we can exclude a role for NO in arousal-induced increases in vaginal blood flow. In this respect, we have shown that a potent and selective PDE type 5 inhibitor has no effect on either pelvic nerve stimulated- or VIP-induced increases in vaginal blood flow ($-5.3 \pm 5.5\%$ change in blood flow at 60μg/kg). Additionally a PDE type 5 inhibitor has a minimal effect on VIP- or electrical field stimulated (EFS)- induced-relaxations of isolated vaginal smooth muscle (30% enhancement of VIP-induced relaxations; See table 1).

Table 1:- Enhancement of VIP mediated relaxation of isolated rabbit vagina. This table illustrated the percentage enhancement of the $EC_{50}$ for VIP-induced relaxations of precontracted vaginal smooth muscle (1μM phenylephrine). Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ types 1, 2, 3 and 4 all significantly potentiated VIP-mediated relaxations whereas a selective inhibitor of $PDE_{cGMP}$ type 5 or vehicle control had no effect on VIP-mediated relaxations.

| PDE inhibitor at selective dose | Percentage enhancement of VIP-induced relaxation |
|---|---|
| $PDE_{cAMP}$ type 1 | **210%** |
| $PDE_{cAMP}$ type 2 | **130%** |
| $PDE_{cAMP}$ type 3 | **220%** |
| $PDE_{cAMP}$ type 4 | **160%** |
| $PDE_{cGMP}$ type 5 | No effect (30%) |
| Control - vehicle | No effect |

We have shown that VIP is also the endogenous NANC (non-adrenergic, non-cholinergic) neurotransmitter partially responsible for EFS-induced relaxations of isolated vaginal smooth muscle. A high dose of a nitric oxide synthase inhibitor (L-NOARG, 300µM) only inhibits 50% of EFS-induced relaxations. A NEP inhibitor (1µM), which will prevent NEP-induced metabolism of VIP and hence enhance VIP signalling, enhances the non-nitric oxide NANC relaxation induced by EFS. We have shown that both NO and VIP regulate smooth muscle tone in the vaginal wall. Therapeutically it will be possible to enhance relaxations of vaginal smooth muscle with agents that enhance NO/cGMP and/or VIP/cAMP mediated signalling.

### *4.5* *VIP induces clitoral vasorelaxation via the cAMP pathway*

The neurotransmitter and second messenger candidates responsible for increases in clitoral blood flow during sexual arousal are currently unidentified. In line with current research into vaginal blood flow, work has speculated and focused on the nitric oxide (NO)/cGMP pathway. There are no reports that VIP plays a role in mediating clitoral blood flow/engorgement although VIP containing neurones have been visualised in clitoral tissue (Hauser-Kronberger *et al.*, 1999).

In this study we demonstrate that:-

1. Infusion of VIP increases clitoral blood flow
2. The cAMP/adenylate cyclase pathway mediates VIP-induced increases in clitoral blood flow
3. VIP is an endogenous clitoral neurotransmitter that is released during sexual arousal:

1. Infusion of VIP (60-200µg/kg, *iv* bolus) induces a concentration dependant increase in clitoral blood flow (figure 5). A 115% increase in clitoral blood flow was observed after an iv infusion of 200µg/kg VIP. This was significantly elevated from control infusions (Hepsaline).
2. The effects of VIP on clitoral blood flow can be mimicked by an infusion of a cAMP mimetic forskolin (40nmol/kg *iv* bolus, Figure 5). A 156% increase in clitoral blood flow was observed after an iv infusion of 40nmol/kg forskolin. This was significantly elevated from control infusions (Hepsaline). Note the amplitude of the response is similar to that induced by VIP (200µg/kg, *iv* bolus) and comparable to those observed on vaginal blood flow in Figs 2 and 4.

These data establish that VIP is capable of increasing clitoral blood flow/vasorelaxation and that this can be mimicked by activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway.

### *4.6 Genital blood flow is enhanced by pharmacological agents that directly or indirectly elevate cAMP levels*

FSAD is associated with and may result from reduced genital blood flow. Potential approaches to treat this disorder revolve around enhancing genital blood flow. Having established that cAMP is the mediator of genital vasorelaxation and that elevations of cAMP result from neuronally released VIP, we believe that if cAMP signalling is enhanced, then as a consequence genital blood flow will be increased, hence restoring genital blood flow to normal levels and treating FSAD.

In a highly preferred aspect, we chose three targets to directly or indirectly enhance cAMP-mediated vasorelaxation - $PDE_{cAMP}$ inhibitors, eg $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitors, NEP (EC 3.4.24.11) inhibitors and neuropeptide Y Y1 (NPY Y1) receptor antagonists.

#### 4.6.1 Neutral Endopeptidase (NEP EC 3.4.24.11) inhibitors

NEP EC 3.4.24.11 metabolises VIP and hence terminates VIP-mediated biological activity. NEP inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of VIP released during arousal. This will have the clinical effect of enhancing genital engorgement.

There have been no previous literature reports of NEP EC3.4.24.11 localisation or of it's functional role in vaginal tissue or a role in sexual arousal.

Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 at clinically relevant doses significantly enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow (See Figure 6).

A NEP inhibitor enhanced the peak increase in vaginal blood flow by up to 53% compared to time matched control increases. This enhancement of submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz), was dose dependant eg 0.1mg/kg iv induced a 35.0±7.6% increase; 0.3mg/kg iv induced a 42.6.0±27.7% increase and 1.0mg/kg iv induced a 52.8±32.5% increase. NEP inhibitors had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow. Hence, the agents of the present invention enhance arousal, by potentiating cAMP signalling, rather than induce arousal in the absence of sexual desire ie by direct increasing cAMP signalling.

Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11, at clinically relevant doses, enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow when compared to time-matched controls. At submaximal doses of VIP (eg. 6.0μg/kg) a significant potentiation in both the peak increase (95±6%) and prolongation of the duration of the enhancement (*circa* 140% - from 7 to in excess of 17 minutes; See Figure 7). NEP inhibitors significantly prolong the duration of VIP-induced elevation of vaginal blood flow when given in combination with dose of VIP that produce maximal flow increases (*circa* 80% increase in duration - 11 to 20 minutes).

NEP inhibitors at clinically relevant doses significantly enhance VIP-induced and nerve-mediated relaxations in isolated tissue. The $EC_{50}$ for VIP is significantly reduced from 18.8±0.6nM to 2.9±0.3nM in the presence of a selective NEP inhibitor (1μM). The effect of the NEP inhibitor is concentration dependent.

NEP EC 3.4.24.11 mRNA message and protein is expressed and has been identified in human and rabbit vagina by Northern and Western analyses.

4.6.2 Phosphodiesterase (PDE) inhibitors

cAMP is degraded by cAMP-hydrolysing PDEs ie. $PDE_{cAMP}$. $PDE_{cAMP}$ inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of cAMP released during arousal. This should have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

There are no literature reports of $PDE_{cAMP}$ localisation or of a functional role of these isozymes in vaginal tissue or a role in sexual arousal. We have shown by PDE profiling of human and rabbit vagina that the following $PDE_{cAMP}$ 1, 2, 3, 4, 7 & 8 isozymes are present. Inhibitors of these $PDE_{cAMP}$ represent potential agents to enhance vaginal blood flow and/or relax vaginal smooth muscle.

A selective inhibitor of $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor at clinically relevant doses significantly enhances pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow (See Figure 8). A $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor (500µg/kg; iv) enhanced the peak increase in vaginal blood flow by 86.8±21.9% compared to increases observed during time matched control (@4Hz).

A selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor significantly enhanced the duration of VIP (60µg/kg)-induced increases in peak vaginal blood flow by over 100% (measured at 50% amplitude; See Figure 9). The selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor significantly enhances the peak increase in blood flow induced by VIP-stimulation (circa 15±3% [200µg/kg]).

significantly enhanced the duration of VIP-induced increases in peak vaginal blood flow by over 100% (measured at 50% amplitude; See Figure 8). The selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor significantly enhances the peak increase in blood flow induced by pelvic nerve stimulation (circa 15±3% [200µg/kg] at 4Hz).

$PDE_{cAMP}$ inhibitors enhance VIP-induced relaxations of precontracted isolated vaginal smooth muscle (1µM phenylephrine; See Table 1). Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ types 1, 2, 3 and 4 all significantly potentiated VIP-mediated relaxations. (210% @ 76nM, 130% @ 8nM, 220% @ 3.4µM and 160% @ 686nM potentiation of VIP $EC_{50}$ values) These inhibitors were administered at dose known to be selective for the particular $PDE_{cAMP}$ of interest. A selective inhibitor of $PDE_{cGMP}$ type 5 or vehicle control had no viable effect on VIP-mediated relaxations.

### 4.6.3 NPY Y1 receptor antagonists

NPY exerts an inhibitory influence over VIP-mediated vasorelaxation and NPY Y1 receptor antagonists will facilitate the vasorelaxant effect of endogenous VIP released during arousal. This will have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

There are no literature reports of NPY receptor localisation or of a functional role for these receptors in vaginal tissue or a role in sexual arousal.

NPY receptor expression studies have identified by Northern and Western analyses that NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes are present in human and rabbit vagina.

Selective inhibitors of NPY Y1 at clinically relevant doses significantly enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow (See Figure 10). An NPY Y1 antagonist enhanced the peak increase in vaginal blood flow by up to 92% compared to time matched control increases. This enhancement of submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz), was dose dependant eg 0.01mg/kg iv induced a 15.8±19.6% increase; 0.03mg/kg iv induced a 35.1±17.17% increase; 0.10mg/kg iv induced a 60.1±16.9% increase and 0.3mg/kg iv induced a 91.9±27.4% increase (mean±sem n=3). NPY Y1 antagonists had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow. This reinforces our view that they will enhance arousal, by potentiating cAMP signalling, rather than induce arousal in the absence of sexual desire ie by direct increasing cAMP signalling.

### 4.7 *Effects of agents that enhance cAMP or increase vaginal blood flow on the mean arterial blood pressure in the anaesthetised rabbit*

In the search for an oral therapy for FSAD it is desirable that there are no associated adverse cardiovascular effects eg effect on blood pressure or heart rate. In our studies, we have found that infusions of VIP significantly reduce mean arterial blood pressure (See Figure 3) and significantly increased heart rate. Hence, in a highly preferred aspect, the agent is not VIP. Pelvic nerve stimulation and inhibitors of $PDE_{cAMP}$ and NEP however had no effect on blood pressure. At 6.0μg/kg VIP (*iv*), caused a significant reduction in mean arterial blood pressure of 13.2±0.7mm Hg and a significant increase in heart rate of 16±4 beats per minute. At higher doses such as 60.0µg/kg VIP (*iv*) caused significant reduction in mean arterial blood pressure of 14.7±1.37mm Hg and this was associated with a significant increase in heart rate of 111±30 beats per minute which then increased mean arterial blood pressure by 8.5±1.4mm Hg.

## COMPOUNDS TESTED

A series of compounds mentioned above were tested in accordance with the present invention and were found to be effective in accordance with the present invention – i.e. they can act as $P_{cAMP}$ in order to treat FSD, in particular FSAD.

These compounds included:

Compound of Formula Ia ("FIa") – *viz* 5-[4-(diethylamino)benzyl]-1-methyl-3-propyl-6,7-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one. FI may be prepared according to the teachings of EP-A-0911333 (Example 50 thereof).

Compound of Formula II ("FII") – *viz* 9-(1-acetyl-4-phenylbutyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-one. FII may be prepared according to the teachings of EP-A-0771799 (Example 100 thereof).

Compound of Formula III ("FIII") – *viz* Milrinone. FIII is a commercially available product.

Compound of Formula IV ("FIV") – *viz* Rolipram. FIV is a commercially available product.

Compound of Formula V ("FV") – *viz* cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[[1-(2-carboxy-4-pentenyl)cyclopentyl]carbonyl]amino]-,1-ethyl ester. FV may be prepared according to the teachings of EP-A-0274234 (Example 300 thereof).

Compound of Formula VI ("FVI") – *viz* cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[[1-(2-carboxy-4-pentenyl)cyclopentyl]carbonyl]amino]-. FVI may be prepared according to the teachings of EP-A-0274234 (Example 379 thereof).

In particular, FI, FII, FIII and FIV are $PDE_{cAMP}$ inhibitors. FI is a I:PDEI, FII is a I:PDEII, FIII is a I:PDEIII and FIV is a I:PDEIV.

The data for these compounds are presented above in the previous Example sections – for example see Table I.

As is evident, these $PDE_{cAMP}$ inhibitors enhance VIP-induced relaxations of isolated tissue.

FII – which is a selective I:PDEII - enhances VIP-induced increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FII also enhances pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI are selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11.

The data presented above in the previous Example sections are for FVI. However, similar results were obtained for FV.

As is evident, FV and FVI enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI also enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI also enhance VIP-induced and nerve-mediated relaxations of isolated tissue at clinically relevant doses.

## ACE ASSAY

### THE PREPARATION AND ASSAY OF SOLUBLE ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE), FROM PORCINE AND HUMAN KIDNEY CORTEX.

Soluble ACE activity is obtained from the kidney cortex and assayed by measuring the rate of cleavage of the ACE substrate Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH to generate its fluorescent product, Abz-Gly.

### 1. MATERIALS

All water is double de ionised.

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 | Human Kidney | IIAM (Pennsylvania. U.S.A.) or UK Human Tissue Bank (UK HTB) |
| 1.2 | Porcine kidney ACE | Sigma (A2580) |

1.3 Homogenisation buffer-1

100mM Mannitol and 20mM Tris @ pH 7.1

2.42g Tris (Fisher T/P630/60) is diluted in 1 litre of water and the pH adjusted to 7.1 using 6M HCl at room temperature. To this 18.22g Mannitol (Sigma M-9546) is added.

1.4 Homogenisation buffer-2

100mM Mannitol, 20mM Tris @ pH7.1 and 10mM $MgCl_2 6H_2O$ (Fisher M0600/53)

To 500ml of the homogenisation buffer 1 (1.4) 1.017g of $MgCl_2$ is added.

1.5 Tris buffer (ACE buffer).

50mM Tris and 300mM NaCl @ pH 7.4

50ml of 50mM Tris pH 7.4 (Sigma T2663) and 17.52g NaCl (Fisher S/3160/60) are made up to 1000ml in water.

1.6 Substrate (Abz-D-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH) (Bachem M-1100)

ACE substrate is stored as a powder at –20°C. A 2mM stock is made by gently re-suspending the substrate in ACE buffer, this must not be vortexed or sonicated. 400µl aliquots of the 2mM stock are stored at –20°C for up to one month.

1.7 Total product

Samples corresponding to 100% substrate to product conversion are included on the plate to enable the % substrate turnover to be determined (see calculations). The total product is generated by incubating 1ml of 2mM substrate with 20µl of enzyme stock for 24 hours at 37°C.

1.8 Stop solution.

0.5M EDTA (Promega CAS[6081/92/6]) is diluted 1:250 in ACE buffer to make a 2mM solution.

1.9 Dimethyl sulphoxide (DMSO).

1.10 Magnesium Chloride -$MgCl_2.6H_2O$ (Fisher M0600/53).

1.11 Black 96 well flat bottom assay plates (Costar 3915 or Packard).

1.12 Topseal A (Packard 6005185).

1.13 Centrifuge tubes

## 2. SPECIFIC EQUIPTMENT

2.1 Sorvall RC-5B centrifuge (SS34 GSA rotor, pre-cooled to 4°C).

2.2 Braun miniprimer mixer.

2.3 Beckman CS-6R centrifuge.

2.4 BMG Fluostar Galaxy.

2.5 Wesbart 1589 shaking incubator.

## 3. METHODS

### 3.1 TISSUE PREPARATION

3.3 Human ACE is obtained from the kidney cortex using a method adapted from Booth, A.G. & Kenny, A.J. (1974) *Biochem. J.* 142, 575-581.

3.3 Frozen kidneys are allowed to thaw at room temperature and the cortex is dissected away from the medulla.

3.4 The cortex is finely chopped and homogenised in approximately 10 volumes of homogenisation buffer-1 (1.4) using a Braun miniprimer (2.2).

3.5 Magnesium chloride (1.11) (20.3mg/gm tissue) is added to the homogenate and stirred in an ice-water bath for 15 minutes.

3.6 The homogenate is centrifuged at 1,500g (3,820rpm) for 12 minutes in a Beckman centrifuge (2.3) before removing the supernatant to a fresh centrifuge tube and discarding the pellet.

3.7 The supernatant is centrifuged at 15,000g (12,100rpm) for 12 minutes in a Sovall centrifuge (2.1) and the supernatant is discarded.

3.8 The pale pink layer on the top of the remaining pellet is removed and re-suspended in homogenisation buffer-2 (1.5) (5ml buffer per 1g tissue).

3.9 The suspension is centrifuged at 2,200g (4,630rpm) for 12 minutes in a Beckman centrifuge before discarding the pellet.

3.10 The supernatant is centrifuged at 15,000g (12,100rpm) for 12 minutes using the Sorvall centrifuge and the supernatant is discarded.

3.11 The final pellet is resuspended in homogenisation buffer-2 (0.5ml buffer per 1g tissue). A homogenous suspension is obtained using a Braun miniprimer. This is then frozen down in 100µl aliquots to be assayed for NEP activity.

## 4.0 DETERMINATION OF ACE ACTIVITY

The activity of the previously aliquoted ACE is measured by its ability to cleave the ACE specific peptide substrate.

Porcine ACE (1.2) is defrosted and resuspended in ACE buffer (1.6) at 0.004U/µl, this is frozen down in 50µl aliquots.

4.1 A 4% DMSO/ACE buffer solution is made (4mls DMSO in 96mls ACE buffer).

4.2 Substrate (1.7), total product (1.8) and enzyme (1.1, 1.2, 1.3), are left on ice to thaw.

4.3 50µl of 4% DMSO/ACE buffer solution is added to each well.

4.4 The 2mM substrate stock is diluted 1:100 to make a 20µM solution. 100µl of 20µM substrate is added to each well (final concentration in the assay 10µM).

4.5 50µl of a range of enzyme dilutions is added to initiate the reaction (usually 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, and 1:3200 are used). 50µl of ACE buffer is added to blank wells.

4.6 The 2mM total product is diluted 1:200 to make 10µM solution. 200µl 10µM product is added to the first four wells of a new plate.

4.7 Plates are incubated at 37°C in a shaking incubator for 60 minutes.

4.8 The enzyme reaction is stopped by the addition of 100µl 2mM EDTA in ACE buffer and incubated at 37°C in a shaking incubator for 20 minutes before being read on the BMG Fluostar Galaxy (ex320/em420).

## 5. ACE INHIBITION ASSAYS

5.1 Substrate, total product, and enzyme stocks are left on ice to thaw.

5.2 Compound stocks are made up in 100% DMSO and diluted 1:25 in ACE buffer to give a 4% DMSO solution. All further dilutions are carried out in a 4% DMSO/ACE buffer solution (4mls DMSO in 96mls ACE buffer).

5.3 50µl of compound, in duplicate, is added to the 96 well plate and 50µl of 4% DMSO/ACE buffer is added to control and blank wells.

5.4 Steps 5.2 and 5.3 can be carried out either by hand or using the Packard multiprobe robots

5.5 The 2mM substrate stock is diluted 1:100 in ACE buffer to make a 20µM solution (10µM final concentration in the assay) (110µl of 2mM substrate added to 10.89ml buffer is enough for 1 plate).

5.6 The enzyme stock is diluted in ACE buffer, as determined from activity checks (4.0).

5.7 The 2mM total product stock is diluted 1:200 in ACE buffer to make a 10µM solution. 200µl is added to the first four wells of a separate plate.

5.8 The 0.5mM EDTA stock is diluted 1:250 to make a 2mM stock (44µl EDTA to 10.96ml ACE buffer).

5.9 To each well of the 96 well plate the following reagents are added:

Table 1: Reagents added to 96 well plate.

| | Compound/ DMSO | Tris Buffer | Substrate | ACE enzyme | Total product |
|---|---|---|---|---|---|
| Samples | 2µl compound | 50µl | 100µl | 50µl | None |
| Controls | 2µl DMSO | 50µl | 100µl | 50µl | None |
| Blanks | 2µl DMSO | 100µl | 100µl | None | None |
| Totals | 2µl DMSO | None | None | None | 200µl |

5.10 50µl of the highest concentration of each compound used in the assay is added in duplicate to the same 96 well plate as the totals (5.7). 150µl of ACE buffer is added to determine any compound fluorescence.

5.11 The reaction is initiated by the addition of the ACE enzyme before incubating at 37°C for 1 hour in a shaking incubator.

5.12 The reaction is stopped by the addition of 100µl 2mM EDTA and incubated at 37°C for 20 minutes in a shaking incubator, before being read on the BMG Fluostar Galaxy (ex320/em420).

## 6. CALCULATIONS

The activity of the ACE enzyme is determined in the presence and absence of compound and expressed as a percentage.

FU = Fluorescence units

(i) % Control activity (turnover of enzyme):

$$\frac{\text{Mean FU of controls} - \text{Mean FU of blanks}}{\text{Mean FU of totals} - \text{Mean FU of blanks}} \times 100$$

(ii) % Activity with inhibitor:

$$\frac{\text{Mean FU of compound} - \text{Mean FU of blanks}}{\text{Mean FU of totals} - \text{Mean FU of blanks}} \times 100$$

(iii) Activity expressed as % of control:

$$\frac{\text{\% Activity with inhibitor}}{\text{\% Control activity}} \times 100$$

OR

$$\frac{\text{Mean FU of compound} - \text{Mean FU of blanks}}{\text{Mean FU of controls} - \text{Mean FU of blanks}} \times 100$$

(iv) % Inhibition = 100 - % control

(v) For fluorescent compounds the mean FU of blanks containing compound (5.10) is deducted from the mean FU of compound values used to calculate the % Activity.

A sigmoidal dose-response curve is fitted to the % activities (% of control) vs compound concentration and $IC_{50}$ values calculated using LabStats fit-curve in Excel.

## CONCLUSIONS

We have developed an animal model that reflects the physiological arousal response observed during female sexual arousal and directly reflects the clinical data obtained in human volunteers. The model uses Laser Doppler technologies to record small changes in vaginal and clitoral blood flow induced by pelvic nerve stimulation or vasoactive neurotransmitters. During sexual arousal, there is an increase in genital blood flow resulting from increased innervation from the pelvic nerve. The pelvic nerve-stimulated increase in vaginal and clitoral blood flow, observed in the animal model, represents the endogenous vascular effects observed during female sexual arousal – i.e. engorgement. Therefore this model can be used to firstly, identify the mechanisms involved in the regulation of vaginal and clitoral blood flow and secondly, to validate novel approaches for the enhancement of genital blood flow.

This study has successfully used a combination of *in vivo*, *in vitro* and biochemical techniques to show that VIP mediates genital blood flow and to identify cAMP as the mediator/second messenger regulating genital vasorelaxation (and vaginal wall relaxation). Using this animal model we have demonstrated that infusion fusion of VIP induces increases in vaginal and clitoral blood flow. Using an inhibitor of VIP metabolism (e.g. a NEP EC3.4.24.11 inhibitor), we have also demonstrated that the increases in genital blood flow observed during pelvic nerve stimulation (ie sexual arousal) is mediated by VIP. We have shown that VIP-mediated increases in genital blood flow result from elevation of tissue cAMP, whereas previously VIP had been shown to increase vaginal blood flow in healthy volunteers but the cellular mechanism was not identified. Additionally, we have demonstrated that genital blood flow can be enhanced directly with a cAMPmimetic or indirectly by elevating cAMP concentrations with a $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor or an NPY Y1 receptor antagonist.

The major cause of FSAD is decreased genital blood flow and this manifests itself as reduced vaginal, labial and clitoral engorgement. Treatment of women with FSAD is achievable by restoration of the *normal* sexual arousal response. This can be achieved by enhancing genital blood flow. Our approach for the treatment of FSAD will be to enhance genital blood flow thereby potentiating vaginal engorgement/lubrication and clitoral engorgement/sensitivity by either directly or indirectly potentiating endogenous cAMP signalling eg with an inhibitor of NEP (EC 3.4.24.11), a cAMP-hydrolysing PDE inhibitor or a NPY receptor antagonist. This will have the overall effect of restoring or potentiating the *normal* arousal response with no cardiovascular side effects. Sexual arousal/engorgement will be enhanced, rather than simply being induced in the absence of sexual drive, which may be the case with some exogenously administered vasoactive agents eg VIP.

In summary therefore, the present invention relates to *inter alia*:

A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, preferably FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia .of a female suffering from FSD, preferably FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, preferably FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD.

A method of treating a female (such as a female suffering from FSD, preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

For these embodiments, preferably the agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

In a highly preferred embodiment, the present invention relates to *inter alia*:

A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, preferably FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is delivered orally.

Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, preferably FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; and wherein said agent is delivered orally.

A method of treating a female (such as a female suffering from FSD, preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is delivered orally.

For these embodiments, preferably the agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

In an additional highly preferred embodiment, the present invention relates to *inter alia*:

A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, preferably FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent potentiates endogenous cAMP.

Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, preferably FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; and wherein said agent potentiates endogenous cAMP.

A method of treating a female (such as a female suffering from FSD, preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent potentiates endogenous cAMP.

For these embodiments, preferably the agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

In a further highly preferred embodiment, the present invention relates to *inter alia*:

A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, preferably FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is delivered orally and wherein said agent potentiates endogenous cAMP.

Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, preferably FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; and wherein said agent is delivered orally and wherein said agent potentiates endogenous cAMP.

A method of treating a female (such as a female suffering from FSD, preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is delivered orally and wherein said agent potentiates endogenous cAMP.

For these embodiments, preferably the agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

All publications mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described methods and system of the present invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the present invention. Although the present invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in biochemistry and biotechnology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

GENERAL TEXT REFERENCES

Ashur-Fabian, O., Perl ,O., Lilling, G., *et al.* (1999). SNV, a lipophilic superactive VIP analog, acts through cGMP to promote neuronal survival. *Peptides*, **20**, 629-633.

Berman, J.R., Berman, L. & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: Incidence, pathophysiology, evaluation, and treatment options. *Urology*, **54**, 385-391.

Berman, J., Goldstein, I., Werbin, T. *et al.* (1999a). Double blind placebo controlled study with crossover to assess effect of sildenafil on physiological parameters of the female sexual response. *J. Urol.*, **161**, 805.

Burnett, A, Calvin, D., Silver, R. *et al.* (1997). Immunohistochemical description of nitric oxide synthase isoforms in human clitoris. *J. Urol.*, **158**, 75-78.

*Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV*, American Psychiatric Association: Washington, DC., 1987, pp 493-518.

Fan, Y.P., Chakder, S. & Ratton, S. (1998). Inhibitory effect of zinc protoporphyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal polypeptide and other receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 468-474.

Foda, H.D., Sharaf, H.H., Absood, A. *et al.* (1995). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides*, **16**, 1057-1061.

Frank, E., Anderson, C. & Rubinstein, D. (1978). Frequency of sexual dysfunction in "normal" couples. *N. Engl. J. Med.*, **229**, 111-115.

Goldstein, I. & Berman, J.R. (1998). Vasculogenic female sexual dysfunction: vaginal engorgement and clitoral erectile insufficiency syndromes. *Int. J. Impot. Res.*, **10**, S84-S90.

Gu, Z.F., Jensen, R.T. & Maton, P.N. (1992). A primary role for protein kinase A in smooth muscle relaxation induced by adrenergic agonists and neuropeptides. *Am. J. Physiol.*, **263**, G360-G364.

Hauser-Kronberger, C., Cheung, A., Hacker, G. *et al.* (1999). Peptidergic innervation of the human clitoris. *Peptides*, **20**, 539-543.

Hoyle, C.H.V., Stones, R.W., Robson, T. *et al.* (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide containing nerves. *J. Anat.*, **188**, 633-644.

Ingenhoven, N. & Beck-Sickinger, A.G. (1997). Flourescent labelled analogues of neuropeptide Y for the characterisation of cells expressing NPY receptor subtypes. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **17**, 407-418.

Jovanovic, A., Jovanovic, S., Tulic,. I. *et al.* (1998). Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Human Reprod.*, **4**, 71-76.

Kaplan, H.S. (1974). The New Sex Therapy. London, Bailliere Tindall.

Kaplan, S.A., Reis, R.B., Kohm, I.J. *et al.* (1999). Safety and efficacy of sildenafil in postmenopausal women with sexual dysfunction. *Urology*, **53**, 481-486.

Kim, Y.C., Choi, H.K., Ahn, Y.S., *et al.* (1994). The effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on rabbit cavernosal smooth muscle contractility. *J. Androl.*, **15**, 392-739.

Laan, E. & Everaerd, W. (1998). Physiological measures of vaginal vasocongestion. *Int. J. Impot. Res.*, **10**, S107-S110.

Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, **10**, S104-S106.

Levin, R.J. (1980). The physiology of sexual function in women. *Clin. Obstet. Gynecol.*, **7**, 213-252.

Levin, R.J. (1991). VIP, vagina, clitoral and preurethral glans: An update on female genital arousal. *Exp. Clin. Endocrinol.*, **98**, 61-69.

Levin, R.J. (1992). The mechanisms of human female sexual arousal. *Ann. Rev. Sex Res.*, 3, 1-48.

Levin, R.J. & Wagner, G. (1986). TRH and vaginal blood flow-effects in concious women and anaesthetised sheep. *J. Physiol.*, 373, 83P.

Lundberg, J.M., Modin, A. & Malmstrom, R.E. (1996). Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists. *Trends. Pharmacol. Sci.*, 17, 301-304.

Masters, W.H., Johnson, V.E. *Human Sexual Response*. Little, Brown: Boston, 1996.

Ottesen, B., Gerstenberg, T., Ulrichsen, H. *et al.* (1983). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases vaginal blood flow and inhibits smooth muscle activity in women. *Eur. J. Clin. Invest.*, 13, 321-324.

Ottesen, B., Wagner, G. & Fahrenkrug, J. *Peptide Innervation of the sexual organs.* In: Handbook of Sexology, Vol. 6, The Pharmacological and Endocrinology of Sexual Function, Sitsen, J.M.A. (eds), Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1988), chapter 4, pp 66-97.

Ottensen, B., Pedersen, B., Nielsen, J. *et al.* (1987). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides*, 8, 797-800.

Park, K., Goldstein, I., Andry, C., *et al.* (1997). Vasculogenic female sexual dysfunction: The hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. *Int. J. Impotence Res.*, 9, 27-37.

Rosen, R., Taylor, J., Leiblum, S. *et al.* (1993). Prevalence of sexual dysfunction in women: results of a survey of 329 women in an outpatient gynecological clinic. *J. Sex Marital Ther.*, 19, 171-188.

Schiavi, R.C. & Seagraves, R.T. (1995). The biology of sexual function. *Psychiat. Clin. North. Am.*, 18, 7-23.

Schoeffter, P. & Stoclet, J.C. (1985). Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, **109**, 275-279.

Serradeil-Le Gal, C., Valette, G., Rouby, P.E. *et al.* (1995). SR 120819A, an orally-active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Letters*, **3**, 192-196.

Sjoberg, I. (1992). The vagina: Morphological, functional and ecological aspects. *Acta Obst. Gynecol. Scand.*, **71**, 84-85.

Spector, I.P. & Carey, M.P. (1990). Incidence and prevalence of sexual dysfunctions: a critical review of the empirical literature. *Arch. Sex. Behav.*, **19**, 389-408.

Wagner, G. (1992). Aspects of genital physiology and pathology. *Sem. Neurol.*, **12**, 87-97.

Werbin, T., Salimpour, P., Berman, L., et al. (1999). Effect of sexual stimulation and age on genital blood flow in women with sexual stimulation. *J. Urol.*, **161**, 688

Wincze, J.P., Albert, A. & Bansal, S. (1993). Sexual arousal in diabetic females: Physiological and self-report measures. *Arch. Sex Behav.*, **22**, 587-601.

Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M. *et al.* (1995). Subtype selectivity and antagonist profile of the nonpeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J Pharmacol Exp Ther.*, **275**, 143-9.

## REFERENCES FOR THE PDE SECTION

Han, P.; Fletcher, C. F.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Yaremko, L. M.; Michaeli, T. : Assignment of the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3 and of the human PDE7A gene to chromosome 8q13. Genomics 48: 275-276, 1998.

2. Michaeli, T.; Bloom, T. J.; Martins, T.; Loughney, K.; Ferguson, K.; Riggs, M.; Rodgers, L.; Beavo, J. A.; Wigler, M. : Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 268: 12925-12932, 1993.

3. Milatovich, A.; Bolger, G.; Michaeli, T.; Francke, U. : Chromosome localizations of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse. Somat. Cell Molec. Genet. 20: 75-86, 1994.

4. Rosman, G. J.; Martins, T. J.; Sonnenburg, W. K.; Beavo, J. A.; Ferguson, K.; Loughney, K. : Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3-prime,5-prime-cyclic nucleotide phosphodiesterase. Gene 191: 89-95, 1997.

## REFERENCES FOR THE NEP SECTION

1. Barker, P. E.; Shipp, M. A.; D'Adamio, L.; Masteller, E. L.; Reinherz, E. L. The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3(q21-q27). J. Immun. 142: 283-287, 1989.

2. D'Adamio, L.; Shipp, M. A.; Masteller, E. L.; Reinherz, E. L. : Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5-prime untranslated regions. Proc. Nat. Acad. Sci. 86: 7103-7107, 1989.

3. Letarte, M.; Vera, S.; Tran, R.; Addis, J. B. L.; Onizuka, R. J.; Quackenbush, E. J.; Jongeneel, C. V.; McInnes, R. R. : Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. J. Exp. Med. 168: 1247-1253, 1988.

4. Shipp, M. A.; Vijayaraghavan, J.; Schmidt, E. V.; Masteller, E. L.; D'Adamio, L.; Hersh, L. B.; Reinherz, E. L. : Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ('enkephalinase'): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. 86: 297-301, 1989.

5. Tran-Paterson, R.; Willard, H. F.; Letarte, M. : The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase--3.4.24.11) gene is located on human chromosome 3. Cancer Genet. Cytogenet. 42: 129-134, 1989.

## REFERENCES FOR THE NPY SECTION

1. Allen, J. M.; Bloom, S. R. : Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8: 1-8, 1986.

2. Bahary, N.; Zorich, G.; Pachter, J. E.; Leibel, R. L.; Friedman, J. M. : Molecular genetic linkage maps of mouse chromosomes 4 and 6. Genomics 11: 33-47, 1991.

3. Baker, E.; Hort, Y. J.; Ball, H.; Sutherland, G. R.; Shine, J.; Herzog, H. : Assignment of the human neuropeptide Y gene to chromosome 7p15.1 by nonisotopic in situ hybridization. Genomics 26: 163-164, 1995.

5. Carr, L. G.; Foroud, T.; Bice, P.; Gobbett, T.; Ivashina, J.; Edenberg, H.; Lumeng, L.; Li, T. K. : A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. Alcohol Clin. Exp. Res. 22: 884-887, 1998.

5. Dockray, G. J. : Neuropeptide Y: in search of a function. Neurochem. Int. 8: 9-11, 1986.

6. Erickson, J. C.; Clegg, K. E.; Palmiter, R. D. : Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. Nature 381: 415-421, 1996. PubMed ID : 8632796

7. Erickson, J. C.; Hollopeter, G.; Palmiter, R. D. : Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274: 1704-1706, 1996.

8. Karvonen, M. K.; Pesonen, U.; Koulu, M.; Niskanen, L.; Laakso, M.; Rissanen, A.; Dekker, J. M.; 't Hart, L. M.; Valve, R.; Uusitupa, M. I. : Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. Nature Med. 4: 1434-1437, 1998.

9. Maccarrone, C.; Jarrott, B. : Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8: 13-22, 1986.

10. Meisler, M. H.; Spence, J. E.; Dixon, J. E.; Caldwell, R. M.; Minth, C. D.; Beaudet, A. L. : Exclusion of close linkage between the loci for cystic fibrosis and neuropeptide Y on human chromosome 7. Cytogenet. Cell Genet. 44: 175-176, 1987.

11. Minth, C. D.; Andrews, P. C.; Dixon, J. E. : Characterization, sequence, and expression of the cloned human neuropeptide Y gene. J. Biol. Chem. 261: 11974-11979, 1986.

12. Minth, C. D.; Bloom, S. R.; Polak, J. M.; Dixon, J. E. : Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 4577-4581, 1984.

13. Takeuchi, T.; Gumucio, D.; Eddy, R.; Meisler, M.; Minth, C.; Dixon, J.; Yamada, T.; Shows, T. : Assignment of the related pancreatic polypeptide (PPY) and neuropeptide Y (NPY) genes to regions on human chromosomes 17 and 7. (Abstract) Cytogenet. Cell Genet. 40: 759 only, 1985.

14. Takeuchi, T.; Gumucio, D. L.; Yamada, T.; Meisler, M. H.; Minth, C. D.; Dixon, J. E.; Eddy, R. E.; Shows, T. B. : Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. J. Clin. Invest. 77: 1038-1041, 1986.

15. Terenghi, G.; Polak, J. M.; Hamid, Q.; O'Brien, E.; Denny, P.; Legon, S.; Dixon, J.; Minth, C. D.; Palay, S. L.; Yasargil, G.; Chan-Palay, V. : Localization of neuropeptide Y mRNA in neurons of human cerebral cortex by means of in situ hybridization with a complementary RNA probe. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 7315-7318, 1987.

16. Thiele, T. E.; Marsh, D. J.; Ste. Marie, L.; Bernstein, I. L.; Palmiter, R. D. : Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. Nature 396: 366-369, 1998.

17. Uusitupa, M. I. J.; Karvonen, M. K.; Pesonen, U.; Koulu, M. : Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism. Ann. Med. 30: 508-510, 1998.

REFERENCES FOR THE NPYR1 SECTION

1. Herzog, H.; Baumgartner, M.; Vivero, C.; Selbie, L. A.; Auer, B.; Shine, J. : Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor. J. Biol. Chem. 268: 6703-6707, 1993.

2. Herzog, H.; Darby, K.; Ball, H.; Hort, Y.; Beck-Sickinger, A.; Shine, J. : Overlapping gene structure of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests coordinate transcriptional regulation. Genomics 41: 315-319, 1997.

3. Herzog, H.; Hort, Y. J.; Ball, H. J.; Hayes, G.; Shine, J.; Selbie, L. A. : Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. Proc. Nat. Acad. Sci. 89: 5794-5798, 1992.

4. Larhammar, D.; Blomqvist, A. G.; Yee, F.; Jazin, E.; Yoo, H.; Wahlestedt, C. : Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. J. Biol. Chem. 267: 10935-10938, 1992.

5. Lutz, C. M.; Frankel, W. N.; Richards, J. E.; Thompson, D. A. : Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

## REFERENCES FOR THE NPYR2 SECTION

1. Ammar, D. A.; Eadie, D. M.; Wong, D. J.; Ma, Y.-Y.; Kolakowski, L. F., Jr.; Yang-Feng, T. L.; Thompson, D. A. : Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide Y receptor gene. Genomics 38: 392-398, 1996.

2. Gerald, C.; Walker, M. W.; Vaysse, P. J.-J.; He, C.; Branchek, T. A.; Weinshank, R. L. : Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. J. Biol. Chem. 270: 26758-26761, 1995.

3. Lutz, C. M.; Frankel, W. N.; Richards, J. E.; Thompson, D. A. : Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

4. Rose, P. M.; Fernandes, P.; Lynch, J. S.; Frazier, S. T.; Fisher, S. M.; Kodukula, K.; Kienzle, B.; Seethala, R. : Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. J. Biol. Chem. 270: 22661-22664, 1995.

## REFERENCES FOR THE VIP SECTION

1. Bodner, M.; Fridkin, M.; Gozes, I. : Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3548-3551, 1985.

2. Gotoh, E.; Yamagami, T.; Yamamoto, H.; Okamoto, H. : Chromosomal assignment of human VIP/PHM-27 gene to 6q26-q27 region by spot blot hybridization and in situ hybridization. Biochem. Int. 17: 555-562, 1988.

3. Gozes, I.; Avidor, R.; Yahav, Y.; Katznelson, D.; Croce, C. M.; Huebner, K. : The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21-6qter. Hum. Genet. 75: 41-44, 1987.

4. Gozes, I.; Nakai, H.; Byers, M.; Avidor, R.; Weinstein, Y.; Shani, Y.; Shows, T. B. : Sequential expression in the nervous system of C-MYB and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24. Somat. Cell Molec. Genet. 13: 305-313, 1987.

5. Heinz-Erian, P.; Dey, R. D.; Flux, M.; Said, S. I. : Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. Science 229: 1407-1408, 1985.

6. Itoh, N.; Obata, K.; Yanaihara, N.; Okamoto, H. : Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature 304: 547-549, 1983.

7. Linder, S.; Barkhem, T.; Norberg, A.; Persson, H.; Schalling, M.; Hokfelt, T.; Magnusson, G. : Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 605-609, 1987.

8. Omary, M. B.; Kagnoff, M. F. : Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line. Science 238: 1578-1581, 1987.

## REFERENCES FOR THE AC SECTION

1. Parma, J.; Stengel, D.; Gannage, M.-H.; Poyard, M.; Barouki, R.; Hanoune, J. : Sequence of a human brain adenylyl cyclase partial cDNA: evidence for a consensus cyclase domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 455-462, 1991.

2. Stengel, D.; Parma, J.; Gannage, M.-H.; Roeckel, N.; Mattel, M.-G.; barouki, R.; Hanoune, J. : Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. Hum. Genet. 90: 126-130, 1992.

## REFERENCES FOR THE VPAC1 SECTION

1. Couvineau, A.; Rouyer-Fessard, C.; Darmoul, D.; Maoret, J.-J.; Carrero, I.; Ogier-Denis, E.; Laburthe, M. : Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains. Biochem. Biophys. Res. Commun. 200: 769-776, 1994.

2. Hashimoto, H.; Nishino, A.; Shintani, N.; Hagihara, N.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Yamamoto, K.; Matsuda, T.; Ishihara, T.; Nagata, S.; Baba, A. : Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VPAC-1) receptor. Genomics 58: 90-93, 1999.

3. Libert, F.; Passage, E.; Parmentier, M.; Simons, M.-J.; Vassart, G.; Mattei, M.-G. : Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonin receptor. Genomics 11: 225-227, 1991.

4. Sreedharan, S. P.; Huang, J.-X.; Cheung, M.-C.; Goetzl, E. J. : Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. Proc. Nat. Acad. Sci. 92: 2939-2943, 1995.

5. Sreedharan, S. P.; Patel, D. R.; Huang, J.-X.; Goetzl, E. J. : Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193: 546-553, 1993.

6. Sreedharan, S. P.; Robichon, A.; Peterson, K. E.; Goetzl, E. J. : Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. 88: 4986-4990, 1991.

7. Vassart, G. : Personal Communication. Brussels, Belgium, 1/15/1992. 8. Wenger, G. D. : Personal Communication. Columbus, Ohio, 8/3/1993.

## REFERENCES FOR THE VPAC2 SECTION

1. Adamou, J. E.; Aiyar, N.; Van Horn, S.; Elshourbagy, N. A. : Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commmun. 209: 385-392, 1995.

2. Mackay, M.; Fantes, J.; Scherer, S.; Boyle, S.; West, K.; Tsui, L.-C.; Belloni, E.; Lutz, E.; Van Heyningen, V.; Harmar, A. J. : Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. Genomics 37: 345-353, 1996.

3. Svoboda, M.; Tastenoy, M.; Van Rampelbergh, J.; Goossens, J.-F.; De Neef, P.; Waelbroeck, M.; Robberecht, P. : Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochem. Biophy. Res. Commun. 205: 1617-1624, 1994.

# SEQUENCE LISTINGS

## 1. NEP (EC 3.4.24.11)

```
LOCUS       HSMRNAEN     3181 bp    mRNA            PRI       12-SEP-1993
DEFINITION  Human mRNA for enkephalinase (EC 3.4.24.11).
ACCESSION   X07166
NID         g34757
VERSION     X07166.1  GI:34757
KEYWORDS    enkephalinase; metalloprotein; neutral endopeptidase.
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
            Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 3181)
  AUTHORS   Malfroy,B., Kuang,W.J., Seeburg,P.H., Mason,A.J. and Schofield,P.R.
  TITLE     Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase
            (neutral endopeptidase)
  JOURNAL   FEBS Lett. 229 (1), 206-210 (1988)
  MEDLINE   88152222
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..3181
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /tissue_type="placenta"
                     /clone_lib="lambda gt10"
                     /clone="lambda H7"
     CDS             18..2249
                     /note="enkephalinase (AA 1-743)"
                     /codon_start=1
                     /protein_id="CAA30157.1"
                     /db_xref="PID:g34758"
                     /db_xref="GI:34758"
                     /db_xref="SWISS-PROT:P08473"
                     /translation="MDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYAT
                     YDDGICKSSDCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKYACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDI
                     LRDELEVVLKDVLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINESAIDSRGGEPLLKLLPDIYGW
                     PVATENWEQKYGASWTAEKAIAQLNSKYGKKVLINLFVGTDDKNSVNHVIHIDQPRLG
                     LPSRDYYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDENQLALEMNKVMELEKEI
                     ANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSLEINGKPFSWLNFTNEIMSTVNISITNE
                     EDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTYKESRNAFRKALY
                     GTTSETATWRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDD
                     LTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNKLNNEYLELNYKEDEYFENIIQNL
                     KFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSL
                     NYGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSASNFKEQSQCMVYQYGNFSW
                     DLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLGQAYRAYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQLFFLN
                     FAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEKKC
                     RVW"
     misc_feature    3073..3078
                     /note="poly A signal"
```

```
BASE COUNT     1055 a    582 c    657 g    887 t
ORIGIN
        1 gcaagtcaga aagtcagatg gatataactg atatcaacac tccaaagcca aagaagaaac
       61 agcgatggac tccactggag atcagcctct cggtccttgt cctgctcctc accatcatag
      121 ctgtgacaat gatcgcactc tatgcaacct acgatgatgg tatttgcaag tcatcagact
      181 gcataaaatc agctgctcga ctgatccaaa acatggatgc caccactgag ccttgtacag
      241 actttttcaa atatgcttgc ggaggctggt tgaaacgtaa tgtcattccc gagaccagct
      301 cccgttacgg caactttgac attttaagag atgaactaga agtcgttttg aaagatgtcc
      361 ttcaagaacc caaaactgaa gatatagtag cagtgcagaa agcaaaagca ttgtacaggt
      421 cttgtataaa tgaatctgct attgatagca gaggtggaga acctctactc aaactgttac
      481 cagacatata tgggtggcca gtagcaacag aaaactggga gcaaaaatat ggtgcttctt
      541 ggacagctga aaaagctatt gcacaactga attctaaata tgggaaaaaa gtccttatta
      601 atttgtttgt tggcactgat gataagaatt ctgtgaatca tgtaattcat attgaccaac
      661 ctcgacttgg cctccccttct agagattact atgaatgcac tggaatctat aaagaggctt
      721 gtacagcata tgtggatttt atgatttctg tggccagatt gattcgtcag gaagaaagat
      781 tgcccatcga tgaaaaccag cttgctttgg aaatgaataa agttatggaa ttggaaaaag
      841 aaattgccaa tgctacggct aaacctgaag atcgaaatga tccaatgctt ctgtataaca
      901 agatgacatt ggcccagatc caaaataact tttcactaga gatcaatggg aagccattca
      961 gctggttgaa tttcacaaat gaaatcatgt caactgtgaa tattagtatt acaaatgagg
     1021 aagatgtggt tgtttatgct ccagaatatt taaccaaact taagcccatt cttaccaaat
     1081 attctgccag agatcttcaa aatttaatgt cctggagatt cataatggat cttgtaagca
     1141 gcctcagccg aacctacaag gagtccagaa atgctttccg caaggccctt tatggtacaa
     1201 cctcagaaac agcaacttgg agacgttgtg caaactatgt caatgggaat atggaaaatg
     1261 ctgtggggag gctttatgtg gaagcagcat ttgctggaga gagtaaacat gtggtcgagg
     1321 atttgattgc acagatccga gaagttttta ttcagacttt agatgacctc acttggatgg
     1381 atgccgagac aaaaaagaga gctgaagaaa aggccttagc aattaaagaa aggatcggct
     1441 atcctgatga cattgtttca aatgataaca aactgaataa tgagtacctc gagttgaact
     1501 acaaagaaga tgaatacttc gagaacataa ttcaaaattt gaaattcagc caaagtaaac
     1561 aactgaagaa gctccgagaa aaggtggaca aagatgagtg gataagtgga gcagctgtag
     1621 tcaatgcatt ttactcttca ggaagaaatc agatagtctt cccagccggc attctgcagc
     1681 ccccttctt tagtgcccag cagtccaact cattgaacta tgggggcatc ggcatggtca
     1741 taggacacga aatcacccat ggcttcgatg acaatggcag aaactttaac aaagatggag
     1801 acctcgttga ctggtggact caacagtctg caagtaactt taaggagcaa tcccagtgca
     1861 tggtgtatca gtatggaaac ttttcctggg acctggcagg tggacagcac cttaatggaa
     1921 ttaatacact gggagaaaac attgctgata atggaggtct tggtcaagca tacagagcct
     1981 atcagaatta tattaaaaag aatggcgaag aaaaattact tcctggactt gacctaaatc
     2041 acaaacaact atttttcttg aactttgcac aggtgtggtg tggaacctat aggccagagt
     2101 atgcggttaa ctccattaaa acagatgtgc acagtccagg caatttcagg attattggga
     2161 ctttgcagaa ctctgcagag ttttcagaag cctttcactg ccgcaagaat tcatacatga
     2221 atccagaaaa gaagtgccgg gtttggtgat cttcaaaaga agcattgcag cccttggcta
     2281 gacttgccaa caccacagaa atggggaatt ctctaatcga aagaaaatgg gccctagggg
     2341 tcactgtact gacttgaggg tgattaacag agagggcacc atcacaatac agataacatt
     2401 aggttgtcct agaaagggtg tggagggagg aaggggtct aaggtctatc aagtcaatca
     2461 tttctcactg tgtacataat gcttaatttc taaagataat attactgttt atttctgttt
     2521 ctcatatggt ctaccagttt gctgatgtcc ctagaaaaca atgcaaaacc tttgaggtag
     2581 accaggattt ctaatcaaaa gggaaaagaa gatgttgaag aatacagtta ggcaccagaa
     2641 gaacagtagg tgacactata gtttaaaaca cattgcctaa ctactagttt ttactttttat
     2701 ttgcaacatt tacagtcctt caaaatcctt ccaaagaatt cttatacaca ttggggcctt
     2761 ggagcttaca tagttttaaa ctcatttttg ccatacatca gttattcatt ctgtgatcat
     2821 ttattttaag cactcttaaa gcaaaaaatg aatgtctaaa attgtttttt gttgtacctg
     2881 ctttgactga tgctgagatt cttcaggctt cctgcaattt tctaagcaat ttcttgctct
```

2941 atctctcaaa acttggtatt tttcagagat ttatataaat gtaaaaataa taattttttat
3001 atttaattat taactacatt tatgagtaac tattattata ggtaatcaat gaatattgaa
3061 gtttcagctt aaaataaaca gttgtgaacc aagatctata aagcgatata cagatgaaaa
3121 tttgagacta tttaaactta taaatcatat tgatgaaaag atttaagcac aaactttagg
3181 g

## 2. PDE type 1

```
LOCUS       HSPDE1A3A    2008 bp    mRNA            PRI       12-APR-1996
DEFINITION  Human 3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase (HSPDE1A3A) mRNA,
            complete cds.
ACCESSION   U40370
NID         g1151108
VERSION     U40370.1  GI:1151108
KEYWORDS    calmodulin-stimulated phosphodiesterase.
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2008)
  AUTHORS   Loughney,K., Martins,T.J., Harris,E.A., Sadhu,K., Hicks,J.B.,
            Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A. and Ferguson,K.
  TITLE     Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human
            calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide
            phosphodiesterases
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 271 (2), 796-806 (1996)
  MEDLINE   96132810
REFERENCE   2  (bases 1 to 2008)
  AUTHORS   Loughney,K., Martins,T.J., Harris,E.A.S., Sadhu,K., Hicks,J.B.,
            Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A. and Ferguson,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-NOV-1995) Kate Loughney, ICOS, 22021 20th Ave. S.E.,
            Bothell, WA 98021, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2008
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            85..1692
                     /gene="PDE1A"
     CDS             85..1692
                     /gene="PDE1A"
                     /note="PDE1A3; type I phosphodiesterase"
                     /codon_start=1
                     /product="3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase"
                     /protein_id="AAC50436.1"
                     /db_xref="PID:g1151109"
                     /db_xref="GI:1151109"
                     /translation="MGSSATEIEELENTTFKYLTGEQTEKMWQRLKGILRCLVKQLER
                     GDVNVVDLKKNIEYAASVLEAVYIDETRRLLDTEDELSDIQTDSVPSEVRDWLASTFT
                     RKMGMTKKKPEEKPKFRSIVHAVQAGIFVERMYRKTYHMVGLAYPAAVIVTLKDVDKW
                     SFDVFALNEASGEHSLKFMIYELFTRYDLINRFKIPVSCLITFAEALEVGYSKYKNPY
                     HNLIHAADVTQTVHYIMLHTGIMHWLTELEILAMVFAAAIHDYEHTGTTNNFHIQTRS
                     DVAILYNDRSVLENHHVSAAYRLMQEEEMNILINLSKDDWRDLRNLVIEMVLSTDMSG
                     HFQQIKNIRNSLQQPEGIDRAKTMSLILHAADISHPAKSWKLHYRWTMALMEEFFLQG
                     DKEAELGLPFSPLCDRKSTMVAQSQIGFIDFIVEPTFSLLTDSTEKIVIPLIEEASKA
                     ETSSYVASSSTTIVGLHIADALRRSNTKGSMSDGSYSPDYSLAAVDLKSFKNNLVDII
                     QQNKERWKELAAQEARTSSQKCEFIHQ"
```

```
BASE COUNT       627 a    400 c    437 g    544 t
ORIGIN
        1 gaattctgat gtgcttcagt gcacagaaca gtaacagatg agctgctttt ggggagagct
       61 tgagtactca gtcggagcat catcatgggg tctagtgcca cagagattga agaattggaa
      121 aacaccactt ttaagtatct tacaggagaa cagactgaaa aaatgtggca gcgcctgaaa
      181 ggaatactaa gatgcttggt gaagcagctg gaaagaggtg atgttaacgt cgtcgactta
      241 aagaagaata ttgaatatgc ggcatctgtg ctggaagcag tttatatcga tgaaacaaga
      301 agacttctgg atactgaaga tgagctcagt gacattcaga ctgactcagt cccatctgaa
      361 gtccgggact ggttggcttc taccttaca cggaaaatgg ggatgacaaa aaagaaacct
      421 gaggaaaaac caaaatttcg gagcattgtg catgctgttc aagctggaat tttgtggaa
      481 agaatgtacc gaaaaacata tcatatggtt ggtttggcat atccagcagc tgtcatcgta
      541 acattaaagg atgttgataa atggtctttc gatgtatttg ccctaaatga agcaagtgga
      601 gagcatagtc tgaagtttat gatttatgaa ctgtttacca gatatgatct tatcaaccgt
      661 ttcaagattc ctgtttcttg cctaatcacc tttgcagaag ctttagaagt tggttacagc
      721 aagtacaaaa atccatatca caatttgatt catgcagctg atgtcactca aactgtgcat
      781 tacataatgc ttcatacagg tatcatgcac tggctcactg aactggaaat tttagcaatg
      841 gtctttgctg ctgccattca tgattatgag catacaggga caacaaacaa ctttcacatt
      901 cagacaaggt cagatgttgc cattttgtat aatgatcgct ctgtccttga gaatcaccac
      961 gtgagtgcag cttatcgact tatgcaagaa gaagaaatga atatcttgat aaatttatcc
     1021 aaagatgact ggagggatct tcggaaccta gtgattgaaa tggttttatc tacagacatg
     1081 tcaggtcact tccagcaaat taaaaatata agaaacagtt tgcagcagcc tgaagggatt
     1141 gacagagcca aaaccatgtc cctgattctc cacgcagcag acatcagcca cccagccaaa
     1201 tcctggaagc tgcattatcg gtggaccatg gccctaatgg aggagttttt cctgcaggga
     1261 gataaagaag ctgaattagg gcttccattt tccccacttt gtgatcggaa gtcaaccatg
     1321 gtggcccagt cacaaatagg tttcatcgat ttcatagtag agccaacatt ttctcttctg
     1381 acagactcaa cagagaaaat tgttattcct cttatagagg aagcctcaaa agccgaaact
     1441 tcttcctatg tggcaagcag ctcaaccacc attgtggggt tacacattgc tgatgcacta
     1501 agacgatcaa atacaaaagg ctccatgagt gatgggtcct attccccaga ctactccctt
     1561 gcagcagtgg acctgaagag tttcaagaac aacctggtgg acatcattca gcagaacaaa
     1621 gagaggtgga aagagttagc tgcacaagaa gcaagaacca gttcacagaa gtgtgagttt
     1681 attcatcagt aaacaccttt aagtaaaacc tcgtgcatgg tggcagctct aatttgacca
     1741 aaagacttgg agattttgat tatgcttgct ggaaatctac cctgtcctgt gtgagacagg
     1801 aaatctattt ttgcagattg ctcaataagc atcatgagcc acataaataa cagctgtaaa
     1861 ctccttaatt caccgggctc aactgctacc gaacagattc atctagtggc tacatcagca
     1921 ccttgtgctt tcagatatct gtttcaatgg cattttgtgg catttgtctt taccgagtgc
     1981 caataaattt tctttgagca aaaaaaaa
//
```

## 3. PDE type 2

```
LOCUS       HSU67733     4240 bp    mRNA            PRI       21-MAY-1997
DEFINITION  Human cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase
            PDE2A3 (PDE2A) mRNA, complete cds.
ACCESSION   U67733
NID         g2108051
VERSION     U67733.1  GI:2108051
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 4240)
  AUTHORS   Rosman,G.J., Martins,T.J., Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A., Ferguson,K.
            and Loughney,K.
  TITLE     Isolation and characterization of human cDNAs encoding a
            cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase
  JOURNAL   Gene 191 (1), 89-95 (1997)
  MEDLINE   97354299
REFERENCE   2  (bases 1 to 4240)
  AUTHORS   Rosman,G.J., Martins,T.J., Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A., Ferguson,K.
            and Loughney,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (21-AUG-1996) Icos Corporation, 22021 20th Ave. S.E.,
            Bothell, WA 98021, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..4240
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            162..2987
                     /gene="PDE2A"
     CDS             162..2987
                     /gene="PDE2A"
                     /function="cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide
                     phosphodiesterase"
                     /note="PDE2 family; splice variant 3"
                     /codon_start=1
                     /product="PDE2A3"
                     /protein_id="AAC51320.1"
                     /db_xref="PID:g2108052"
                     /db_xref="GI:2108052"
                     /translation="MGQACGHSILCRSQQYPAARPAEPRGQQVFLKPDEPPPPPQPCA
                     DSLQDALLSLGSVIDISGLQRAVKEALSAVLPRVETVYTYLLDGESQLVCEDPPHELP
                     QEGKVREAIISQKRLGCNGLGFSDLPGKPLARLVAPLAPDTQVLVMPLADKEAGAVAA
                     VILVHCGQLSDNEEWSLQAVEKHTLVALRRVQVLQQRGPREAPRAVQNPPEGTAEDQK
                     GGAAYTDRDRKILQLCGELYDLDASSLQLKVLQYLQQETRASRCCLLLVSEDNLQLSC
                     KVIGDKVLGEEVSFPLTGCLGQVVEDKKSIQLKDLTSEDVQQLQSMLGCELQAMLCVP
                     VISRATDQVVALACAFNKLEGDLFTDEDEHVIQHCFHYTSTVLTSTLAFQKEQKLKCE
                     CQALLQVAKGLFTHLDDVSVLLQEIITEARNLSNAEICSVFLLDQNELVAKVFDGGVV
                     DDESYEIRIPADQGIAGHVATTGQILNIPDAYAHPLFYRGVDDSTGFRTRNILCFPIK
                     NENQEVIGVAELVNKINGPWFSKFDEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHL
                     ANEMMMYHMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQ
                     DMNFINNYKIDCPTLARFCLMVKKGYRDPPYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLE
                     DIEIFALFISCMCHDLDHRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSVMERHHFAQAIAILNT
                     HGCNIFDHFSRKDYQRMLDLMRDIILATDLAHHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHHRL
                     LLCLLMTSCDLSDQTKGWKTTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIP
                     ELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNREHWTKVSHKFTIRGLPSNNSLD
                     FLDEEYEVPDLDGTRAPINGCCSLDAE*
BASE COUNT      902 a   1260 c   1202 g    876 t
ORIGIN
        1 cagcagagct ggattggggt gttgagtcca ggctgagtag gggcagccc actgctcttg
       61 gtccctgtgc ctgctggggg tgccctgccc tgaactccag gcagcgggga cagggcgagg
      121 tgccacctta gtctggctgg ggaggcggac gatgaggagt gatggggcag gcatgcggcc
      181 actccatcct ctgcaggagc cagcagtacc cggcagcgcg accggctgag ccgcggggcc
      241 agcaggtctt cctcaagccg gacgagccgc cgccgccgcc gcagccatgc gccgacagcc
      301 tgcaggacgc cttgctgagt ctgggctctg tcatcgacat ttcaggcctg caacgtgctg
      361 tcaaggaggc cctgtcagct gtgctccccc gagtggaaac tgtctacacc tacctactgg
      421 atggtgagtc ccagctggtg tgtgaggacc ccccacatga gctgccccag gaggggaaag
      481 tccgggaggc tatcatctcc cagaagcggc tgggctgcaa tgggctgggc ttctcagacc
      541 tgccagggaa gcccttggcc aggctggtgg ctccactggc tcctgatacc caagtgctgg
      601 tcatgccgct agcggacaag gaggctgggg ccgtggcagc tgtcatcttg gtgcactgtg
      661 gccagctgag tgataatgag gaatggagcc tgcaggcggt ggagaagcat accctggtcg
      721 ccctgcggag ggtgcaggtc ctgcagcagc gcgggcccag ggaggctccc cgagccgtcc
      781 agaacccccc ggaggggacg gcggaagacc agaagggcgg ggcggcgtac accgaccgcg
      841 accgcaagat cctccaactg tgcggggaac tctacgacct ggatgcctct tccctgcagc
      901 tcaaagtgct ccaatacctg cagcaggaga cccgggcatc ccgctgctgc ctcctgctgg
      961 tgtcggagga caatctccag ctttcttgca aggtcatcgg agacaaagtg ctcggggaag
     1021 aggtcagctt tcccttgaca ggatgcctgg gccaggtggt ggaagacaag aagtccatcc
     1081 agctgaagga cctcacctcc gaggatgtac aacagctgca gagcatgttg ggctgtgagc
     1141 tgcaggccat gctctgcgtc cctgtcatca gccgggccac tgaccaggtg gtggccttgg
     1201 cctgcgcctt caacaagcta gaaggagact tgttcaccga cgaggacgag catgtgatcc
     1261 agcactgctt ccactacacc agcaccgtgc tcaccagcac cctggccttc cagaaggaac
     1321 agaaactcaa gtgtgagtgc caggctcttc tccaagtggc aaagaacctc ttcacccacc
     1381 tggatgacgt ctctgtcctg ctccaggaga tcatcacgga ggccagaaac ctcagcaacg
     1441 cagagatctg ctctgtgttc ctgctggatc agaatgagct ggtggccaag gtgttcgacg
     1501 ggggcgtggt ggatgatgag agctatgaga tccgcatccc ggccgatcag ggcatcgcgg
     1561 gacacgtggc gaccacgggc cagatcctga acatccctga cgcatatgcc catccgcttt
     1621 tctaccgcgg cgtggacgac agcaccggct tccgcacgcg caacatcctc tgcttcccca
     1681 tcaagaacga gaaccaggag gtcatcggtg tggccgagct ggtgaacaag atcaatgggc
     1741 catggttcag caagttcgac gaggacctgg cgacggcctt ctccatctac tgcggcatca
     1801 gcatcgccca ttctctccta tacaaaaaag tgaatgaggc tcagtatcgc agccacctgg
     1861 ccaatgagat gatgatgtac cacatgaagg tctccgacga tgagtatacc aaacttctcc
     1921 atgatgggat ccagcctgtg gctgccattg actccaattt tgcaagtttc acctataccc
     1981 ctcgttccct gcccgaggat gacacgtcca tggccatcct gagcatgctg caggacatga
     2041 atttcatcaa caactacaaa attgactgcc cgaccctggc ccggttctgt ttgatggtga
     2101 agaagggcta ccgggatccc ccctaccaca actggatgca cgccttttct gtctcccact
     2161 tctgctacct gctctacaag aacctggagc tcaccaacta cctcgaggac atcgagatct
     2221 ttgccttgtt tatttcctgc atgtgtcatg acctggacca cagaggcaca aacaactctt
     2281 tccaggtggc ctcgaaatct gtgctggctg cgctctacag ctctgagggc tccgtcatgg
```

```
2341 agaggcacca ctttgctcag gccatcgcca tcctcaacac ccacggctgc aacatctttg
2401 atcatttctc ccggaaggac tatcagcgca tgctggatct gatgcgggac atcatcttgg
2461 ccacagacct ggcccaccat ctccgcatct tcaaggacct ccagaagatg gctgaggtgg
2521 gctacgaccg aaacaacaag cagcaccaca gacttctcct ctgcctcctc atgacctcct
2581 gtgacctctc tgaccagacc aagggctgga agactacgag aaagatcgcg gagctgatct
2641 acaaagaatt cttctcccag ggagacctgg agaaggccat gggcaacagg ccgatggaga
2701 tgatggaccg ggagaaggcc tatatccctg agctgcaaat cagcttcatg gagcacattg
2761 caatgcccat ctacaagctg ttgcaggacc tgttccccaa agcggcagag ctgtacgagc
2821 gcgtggcctc caaccgtgag cactggacca aggtgtccca caagttcacc atccgcggcc
2881 tcccaagtaa caactcgctg gacttcctgg atgaggagta cgaggtgcct gatctggatg
2941 gcactagggc cccccatcaat ggctgctgca gccttgatgc tgagtgatcc cctccaggac
3001 acttccctgc ccaggccacc tcccacagcc ctccactggt ctggccagat gcactgggaa
3061 cagagccacg ggtcctgggt cctagaccag gacttcctgt gtgaccctgg acaagtacta
3121 ccttcctggg cctcagcttt ctcgtctgta taatggaagc aagacttcca acctcacgga
3181 gactttgtaa tttgcttctc tgagagcaca ggggtgacca atgagcagtg ggccctactc
3241 tgcacctctg accacacctt ggcaagtctt tcccaagcca ttctttgtct gagcagcttg
3301 atggtttctc cttgccccat ttctgcccca ccagatcttt gctcctttcc ctttgaggac
3361 tcccaccctt tgggtctcca ggatccccat ggaaggggaa ggtgagacat ctgagtgagc
3421 agagtgtggc atcttggaaa cagtccttag ttctgtggga ggactagaaa cagccgcggc
3481 gaaggccccc tgaggaccac tactatactg atggtgggat tgggacctgg gggatacagg
3541 ggcccccagga agaagctggc cagaggggca gctcagtgct ctgcagagag gggccctggg
3601 gagaagcagg atgggattga tgggcaggag ggatccccgc actgggagac aggcccaggt
3661 atgaatgagc cagccatgct tcctcctgcc tgtgtgacgc tgggcgagtc tcttcccctg
3721 tctgggccaa acagggagcg ggtaagacaa tccatgctct aagatccatt ttagatcaat
3781 gtctaaaata gctctatggc tctgcggagt cccagcagag gctatggaat gtttctgcaa
3841 ccctaaggca cagagagcca accctgagtg tctcagaggc cccctgagtg ttccccttgg
3901 cctgagcccc ttacccattc ctgcagccag tgagagacct ggcctcagcc tggcagcgct
3961 ctcttcaagg ccatatccac ctgtgccctg gggcttggga gaccccatag gccgggactc
4021 ttgggtcagc ccgccactgg cttctctctt tttctccgtt tcattctgtg tgcgttgtgg
4081 ggtgggggag gggtccacc tgccttacct ttctgagttg cctttagaga gatgcgtttt
4141 tctaggactc tgtgcaactg tcgtatatgg tcccgtgggc tgaccgcttt gtacatgaga
4201 ataaatctat ttctttctac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

1583
1584

## 4. NPY

```
LOCUS       HUMNPY          551 bp    mRNA            PRI       07-JAN-1995
DEFINITION  Human neuropeptide Y (NPY) mRNA, complete cds.
ACCESSION   K01911
NID         g189273
VERSION     K01911.1  GI:189273
KEYWORDS    neuropeptide Y.
SOURCE      Human phaeochromocytoma, cDNA to mRNA, clone pNPY3-75.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 551)
  AUTHORS   Minth,C.D., Bloom,S.R., Polak,J.M. and Dixon,J.E.
  TITLE     Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA
            encoding neuropeptide tyrosine
  JOURNAL   Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 (14), 4577-4581 (1984)
  MEDLINE   84272678
COMMENT     Neuropeptide Y (NPY) is one of the most abundant peptides in the
            mammalian nervous system, and its extensive distribution suggests a
            neuro-transmitter or -modulator role. NPY is also found in some
            chromaffin cells of the adrenal medulla.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..551
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /tissue_type="phaeochromocytoma"
                     /map="7pter-q22"
     mRNA            <1..551
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
     gene            1..551
                     /gene="NPY"
     sig_peptide     87..170
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
     CDS             87..380
                     /gene="NPY"
                     /codon_start=1
                     /db_xref="GDB:G00-119-456"
                     /product="neuropeptide Y"
                     /protein_id="AAA59944.1"
                     /db_xref="PID:g189274"
                     /db_xref="GI:189274"
                     /translation="MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAED
                     MARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRLEDPAMW"
     mat_peptide     171..278
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
                     /product="neuropeptide Y"
BASE COUNT      131 a    171 c    129 g    120 t
ORIGIN      51 bp upstream of RsaI site.
        1 accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc
       61 ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgactgggg ctgtccggac
      121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgaggcg taccccctca
      181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
      241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
      301 cactgatttc agacctcttg atgagagaaa gcacagaaaa tgttcccaga actcggcttg
      361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
      421 gcccatattt catcgtgtaa aacgagaatc cacccatcct accaatgcat gcagccactg
      481 tgctgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
      541 atcatgcatt c
```

## 6. NPY Y1 Receptor

```
LOCUS       A26481       2624 bp    mRNA            PAT       17-OCT-1995
DEFINITION  Human NPY receptor Y1 gene cDNA.
ACCESSION   A26481
NID         g1247452
VERSION     A26481.1  GI:1247452
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
            Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2624)
  AUTHORS   .
  TITLE     HUMAN NEUROPEPTIDE Y-Y1 RECEPTOR
  JOURNAL   Patent: WO 9309227-A 3 13-MAY-1993;
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2624
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     CDS             152..1306
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y Y1 receptor"
                     /protein_id="CAA01819.1"
                     /db_xref="PID:e205126"
                     /db_xref="PID:g1247453"
                     /db_xref="GI:1247453"
                     /db_xref="SWISS-PROT:P25929"
                     /translation="MNSTLFSQVENHSVHSNFSEKNAQLLAFENDDCHLPLAMIFTLA
                     LAYGAVIILGVSGNLALIIIILKQKEMRNVTNILIVNLSFSDLLVAIMCLPFTFVYTL
                     MDHWVFGEAMCKLNPFVQCVSITVSIFSLVLIAVERHQLIINPRGWRPNNRHAYVGIA
                     VIWVLAVASSLPFLIYQVMTDEPFQNVTLDAYKDKYVCFDQFPSDSHRLSYTTLLLVL
                     QYFGPLCFIFICYFKIYIRLKRRNNMMDKMRDNKYRSSETKRINIMLLSIVVAFAVCW
                     LPLTIFNTVFDWNHQIIATCNHNLLFLLCHLTAMISTCVNPIFYGFLNKNFQRDLQFF
                     FNFCDFRSRDDDYETIAMSTMHTDVSKTSLKQASPVAFKKINNNDDNEKI"
BASE COUNT      791 a    479 c    473 g    878 t       3 others
ORIGIN          .
        1 attgttcagt tcaagggaat gaagaattca gaataatttt ggtaaatgga ttccaatatc
       61 gggaataaga ataagctgaa cagttgacct gctttgaaga aacatactgt ccatttgtct
      121 aaaataatct ataacaacca aaccaatcaa aatgaattca acattatttt cccaggttga
      181 aaatcattca gtccactcta atttctcaga gaagaatgcc cagcttctgg cttttgaaaa
      241 tgatgattgt catctgccct tggccatgat atttacctta gctcttgctt atggagctgt
      301 gatcattctt ggtgtctctg gaaacctggc cttgatcata atcatcttga aacaaaagga
      361 gatgagaaat gttaccaaca tcctgattgt gaacctttcc ttctcagact tgcttgttgc
      421 catcatgtgt ctcccctta catttgtcta cacattaatg gaccactggg tctttggtga
      481 ggcgatgtgt aagttgaatc cttttgtgca atgtgtttca atcactgtgt ccattttctc
      541 tctggttctc attgctgtgg aacgacatca gctgataatc aaccctcgag ggtggagacc
      601 aaataataga catgcttatg taggtattgc tgtgatttgg gtccttgctg tggcttcttc
      661 tttgcctttc ctgatctacc aagtaatgac tgatgagccg ttccaaaatg taacacttga
```

```
 721 tgcgtacaaa gacaaatacg tgtgctttga tcaatttcca tcggactctc ataggttgtc
 781 ttataccact ctcctcttgg tgctgcagta ttttggtcca ctttgtttta tatttatttg
 841 ctacttcaag atatatatac gcctaaaaag gagaaacaac atgatggaca agatgagaga
 901 caataagtac aggtccagtg aaaccaaaag aatcaatatc atgctgctct ccattgtggt
 961 agcatttgca gtctgctggc tccctcttac catctttaac actgtgtttg attggaatca
1021 tcagatcatt gctacctgca accacaatct gttattcctg ctctgccacc tcacagcaat
1081 gatatccact tgtgtcaacc ccatatttta tgggttcctg aacaaaaact tccagagaga
1141 cttgcagttc ttcttcaact tttgtgattt ccggtctcgg gatgatgatt atgaaacaat
1201 agccatgtcc acgatgcaca cagatgtttc caaaacttct ttgaagcaag caagcccagt
1261 cgcatttaaa aaaatcaaca acaatgatga taatgaaaaa atctgaaact acttatagcc
1321 tatggtcccg gatgacatct gtttaaaaac aagcacaacc tgcaacatac tttgattacc
1381 tgctctccca aggaatgggg ttgaaatcat ttgaaaatga ctaagatttt cttgtcttgc
1441 tttttactg cttttgttgt agtgtcataa ttacatttgg aacaaaaggt gtgggctttg
1501 gggtcttctg gaaatagttt tgaccagaca tctttgaagt gctttttgtg aatttatgca
1561 tataatataa agacttttat actgtactta ttggaatgaa atttctttaa agtattacga
1621 tnnnctgact tcagaagtac ctgccatcca atacggtcat tagattgggt catcttgatt
1681 agattagatt agattagatt gtcaacagat tgggccatcc ttactttatg ataggcatca
1741 ttttagtgtg ttacaatagt aacagtatgc aaaagcagca ttcaggagcc gaaagatagt
1801 cttgaagtca ttcagaagtg gtttgaggtt tctgtttttt ggtggttttt gtttgttttt
1861 tttttttttc accttaaggg aggctttcat ttcctcccga ctgattgtca cttaaatcaa
1921 aatttaaaaa tgaataaaaa gacatacttc tcagctgcaa atattatgga gaattgggca
1981 cccacaggaa tgaagagaga aagcagctcc ccaacttcaa aaccattttg gtacctgaca
2041 acaagagcat tttagagtaa ttaatttaat aaagtaaatt agtattgctg caaatagcta
2101 aattatattt atttgaattg atggtcaaga gattttccat ttttttaca gactgttcag
2161 tgtttgtcaa gcttctggtc taatatgtac tcgaaagact ttccgcttac aatttgtaga
2221 aacacaaata tcgttttcca tacagcagtg cctatatagt gactgatttt aactttcaat
2281 gtccatcttt caaaggaagt aacaccaagg tacaatgtta aaggaatatt cactttacct
2341 agcagggaaa aatacacaaa aactgcagat acttcatata gcccatttta acttgtataa
2401 actgtgtgac ttgtggcgtc ttataaataa tgcactgtaa agattactga atagttgtgt
2461 catgttaatg tgcctaattt catgtatctt gtaatcatga ttgagcctca gaatcatttg
2521 gagaaactat attttaaaga acaagacata cttcaatgta ttatacagat aaagtattac
2581 atgtgtttga ttttaaaagg gcggacattt tattaaaatc aagg
```

## 6. NPY Y2 Receptor

```
LOCUS       HSU36269      1200 bp    mRNA            PRI       14-NOV-1995
DEFINITION  Human neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor mRNA, complete cds.
ACCESSION   U36269
NID         g1063633
VERSION     U36269.1  GI:1063633
KEYWORDS    .
SOURCE      Human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1200)
  AUTHORS   Gerald,C., Walker,M.W., Vaysse,P.J., He,C., Branchek,T.A. and
            Weinshank,R.L.
  TITLE     Expression cloning and pharmacological characterization of a human
            hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 270 (45), 26758-26761 (1995)
  MEDLINE   96070760
REFERENCE   2  (bases 1 to 1200)
  AUTHORS   Gerald,C.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (13-SEP-1995) Christophe A. Gerald, Synaptic
            Pharmaceutical Corporation, Molecular Biology, 215 College Road,
            Paramus, NJ 07652, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1200
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /clone="hhY2"
                     /sex="male"
                     /tissue_type="brain hippocampus"
                     /dev_stage="adult"
     5'UTR           1..20
     CDS             21..1166
                     /note="NPY/PYY Y2 receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor"
                     /protein_id="AAC50281.1"
                     /db_xref="PID:g1063634"
                     /db_xref="GI:1063634"
                     /translation="MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGPQTTPRGELVPDPEPELIDST
                     KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTL
                     CLPFTLTYTLMGEWKMGPVLCHLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKI
                     SKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEKSIYGTV
                     YSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAANDHYHQRRQKTTKMLVCVVVV
                     FAVSWLPLHAFQLAVDIDSQVLDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRK
                     AFLSAFRCEQRLDAISEVSVTFKAKKNLEVRKNSGPNDSFTEATNV"
     3'UTR           1164..1200
```

```
BASE COUNT      292 a    295 c    299 g    314 t
ORIGIN
        1 caagtggacc tgtactgaaa atgggtccaa taggtgcaga ggctgatgag aaccagacag
       61 tggaagaaat gaaggtggaa caatacgggc cacaaacaac tcctagaggt gaactggtcc
      121 ctgaccctga gccagagctt atagatagta ccaagctgat tgaggtacaa gttgttctca
      181 tattggccta ctgctccatc atcttgcttg gggtaattgg caactccttg gtgatccatg
      241 tggtgatcaa attcaagagc atgcgcacag taaccaactt tttcattgcc aatctggctg
      301 tggcagatct tttggtgaac actctgtgtc taccgttcac tcttacctat accttaatgg
      361 gggagtggaa aatgggtcct gtcctgtgcc acctggtgcc ctatgcccag ggcctggcag
      421 tacaagtatc cacaatcacc ttgacagtaa ttgccctgga ccggcacagg tgcatcgtct
      481 accacctaga gagcaagatc tccaagcgaa tcagcttcct gattattggc ttggcctggg
      541 gcatcagtgc cctgctggca agtcccctgg ccatcttccg ggagtattcg ctgattgaga
      601 tcatcccgga ctttgagatt gtggcctgta ctgaaaagtg gcctggcgag gagaagagca
      661 tctatggcac tgtctatagt ctttcttcct tgttgatctt gtatgttttg cctctgggca
      721 ttatatcatt ttcctacact cgcatttgga gtaaattgaa gaaccatgtc agtcctggag
      781 ctgcaaatga ccactaccat cagcgaaggc aaaaaaccac caaaatgctg gtgtgtgtgg
      841 tggtggtgtt tgcggtcagc tggctgcctc tccatgcctt ccagcttgcc gttgacattg
      901 acagccaggt cctggacctg aaggagtaca aactcatctt cacagtgttc cacatcatcg
      961 ccatgtgctc cacttttgcc aatccccttc tctatggctg gatgaacagc aactacagaa
     1021 aggctttcct ctcggccttc cgctgtgagc agcggttgga tgccattcac tctgaggtgt
     1081 ccgtgacatt caaggctaaa aagaacctgg aggtcagaaa gaacagtggc cccaatgact
     1141 ctttcacaga ggctaccaat gtctaaggaa gctgtggtgt gaaaatgtat ggatgaattc
```

1586
1587

## 7. NPY Y5 Receptor

```
LOCUS       HSU66275     1370 bp    mRNA            PRI       18-OCT-1996
DEFINITION  Human neuropeptide Y5 receptor (NPYR5) mRNA, complete cds.
ACCESSION   U66275
NID         g1620655
VERSION     U66275.1  GI:1620655
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1370)
  AUTHORS   Hu,Y., Bloomquist,B.T., Cornfield,L.J., DeCarr,L.B.,
            Flores-Riveros,J.R., Friedman,L., Jiang,P., Lewis-Higgins,L.,
            Sadlowski,Y., Schaefer,J., Velazquez,N. and McCaleb,M.L.
  TITLE     Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor
            associated with feeding behavior
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 271 (42), 26315-26319 (1996)
  MEDLINE   96421636
REFERENCE   2  (bases 1 to 1370)
  AUTHORS   Hu,Y., Bloomquist,B.T., Cornfield,L.J., DeCarr,L.B.,
            Flores-Riveros,J.R., Friedman,L., Jiang,P., Lewis-Higgins,L.,
            Sadlowski,Y., Schaefer,J., Velazquez,N. and McCaleb,M.L.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-AUG-1996) Metabolic Disorders, Bayer Corporation, 400
            Morgan Lane, West Haven, CT 06516, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1370
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            18..1355
                     /gene="NPYR5"
     CDS             18..1355
                     /gene="NPYR5"
                     /function="G protein-coupled receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y5 receptor"
                     /protein_id="AAC50741.1"
                     /db_xref="PID:g1620656"
                     /db_xref="GI:1620656"
                     /translation="MDLELDEYYNKTLATENNTAATRNSDFPVWDDYKSSVDDLQYFL
                     IGLYTFVSLLGFMGNLLILMALMKKRNQKTTVNFLIGNLAFSDILVVLFCSPFTLTSV
                     LLDQWMFGKVMCHIMPFLQCVSVLVSTLILISIAIVRYHMIKHPISNNLTANHGYFLI
                     ATVWTLGFAICSPLPVFHSLVELQETFGSALLSSRYLCVESWPSDSYRIAFTISLLLV
                     QYILPLVCLTVSHTSVCRSISCGLSNKENRLEENEMINLTLHPSKKSGPQVKLSGSHK
                     WSYSFIKKHRRRYSKKTACVLPAPERPSQENHSRILPENFGSVRSQLSSSSKFIPGVP
                     TCFEIKPEENSDVHELRVKRSVTRIKKRSRSVFYRLTILILVFAVSWMPLHLFHVVTD
                     FNDNLISNRHFKLVYCICHLLGMMSCCLNPILYGFLNNGIKADLVSLIHCLHM"
```

```
BASE COUNT      392 a    263 c    257 g    458 t
ORIGIN
        1 ccaagcagga ctataatatg gatttagagc tcgacgagta ttataacaag acacttgcca
       61 cagagaataa tactgctgcc actcggaatt ctgatttccc agtctgggat gactataaaa
      121 gcagtgtaga tgacttacag tattttctga ttgggctcta tacatttgta agtcttcttg
      181 gctttatggg gaatctactt attttaatgg ctctcatgaa aaagcgtaat cagaagacta
      241 cggtaaactt cctcataggc aatctggcct tttctgatat cttggttgtg ctgttttgct
      301 caccttttcac actgacgtct gtcttgctgg atcagtggat gtttggcaaa gtcatgtgcc
      361 atattatgcc ttttcttcaa tgtgtgtcag ttttggtttc aactttaatt ttaatatcaa
      421 ttgccattgt caggtatcat atgataaaac atcccatatc taataattta acagcaaacc
      481 atggctactt tctgatagct actgtctgga cactaggttt tgccatctgt tctccccttc
      541 cagtgtttca cagtcttgtg gaacttcaag aaacatttgg ttcagcattg ctgagcagca
      601 ggtatttatg tgttgagtca tggccatctg attcatacag aattgccttt actatctctt
      661 tattgctagt tcagtatatt ctgcccttag tttgtcttac tgtaagtcat acaagtgtct
      721 gcagaagtat aagctgtgga ttgtccaaca aagaaaacag acttgaagaa aatgagatga
      781 tcaacttaac tcttcatcca tccaaaaaga gtgggcctca ggtgaaactc tctggcagcc
      841 ataaatggag ttattcattc atcaaaaaac acagaagaag atatagcaag aagacagcat
      901 gtgtgttacc tgctccagaa agaccttctc aagagaacca ctccagaata cttccagaaa
      961 actttggctc tgtaagaagt cagctctctt catccagtaa gttcatacca ggggtcccca
     1021 cttgctttga gataaaacct gaagaaaatt cagatgttca tgaattgaga gtaaaacgtt
     1081 ctgttacaag aataaaaaag agatctcgaa gtgttttcta cagactgacc atactgatat
     1141 tagtatttgc tgttagttgg atgccactac accttttcca tgtggtaact gattttaatg
     1201 acaatcttat ttcaaatagg catttcaagt tggtgtattg catttgtcat ttgttgggca
     1261 tgatgtcctg ttgtcttaat ccaattctat atgggtttct taataatggg attaaagctg
     1321 atttagtgtc ccttatacac tgtcttcata tgtaataatt ctcactgttt
```

## 8. VIP

```
LOCUS       VIP          1511 bp    mRNA            PRI       19-MAR-1999
DEFINITION  Homo sapiens vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA.
ACCESSION   NM_003381
NID         g4507896
VERSION     NM_003381.1  GI:4507896
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1511)
  AUTHORS   DeLamarter,J.F., Buell,G.N., Kawashima,E., Polak,J.M. and
            Bloom,S.R.
  TITLE     Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in
            bacterial cells
  JOURNAL   Peptides 6 Suppl 1, 95-102 (1985)
  MEDLINE   86016352
COMMENT     REFSEQ: This reference sequence was derived from M36634.
            PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
            that has not yet been subject to human review. The final curated
            reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1511
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579
                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                    ./protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331
BASE COUNT      541 a    255 c    276 g    439 t
ORIGIN
        1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
       61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
      121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
      181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
      241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
      301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
      361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
      421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
      481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
      541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
      601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
      661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
      721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
      781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
      841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
      901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
      961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
     1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
     1081 ataaaaagac attcttccaa aaagattttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
     1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
     1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
     1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
     1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
     1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
     1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
     1501 aaaaaaaaaa a
```

## 9. VPAC1 Receptor

```
LOCUS       VIP            1511 bp    mRNA            PRI       19-MAR-1999
DEFINITION  Homo sapiens vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA.
ACCESSION   NM_003381
NID         g4507896
VERSION     NM_003381.1  GI:4507896
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1511)
  AUTHORS   DeLamarter,J.F., Buell,G.N., Kawashima,E., Polak,J.M. and
            Bloom,S.R.
  TITLE     Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in
            bacterial cells
  JOURNAL   Peptides 6 Suppl 1, 95-102 (1985)
  MEDLINE   86016352
COMMENT     REFSEQ: This reference sequence was derived from M36634.
            PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
            that has not yet been subject to human review. The final curated
            reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1511
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579
                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
```

```
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331
BASE COUNT      541 a    255 c    276 g    439 t
ORIGIN
        1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
       61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
      121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
      181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
      241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
      301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
      361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
      421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
      481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
      541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
      601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
      661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
      721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
      781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaagcctgc aatttcatat
      841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
      901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
      961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
     1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
     1081 ataaaaagac attcttccaa aaagattttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
     1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
     1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
     1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
     1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
     1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
     1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
     1501 aaaaaaaaaa a
```

1589

## 10. VPAC2 Receptor

```
LOCUS       HUMHVRP      1640 bp    mRNA            PRI       16-FEB-1995
DEFINITION  Human helodermin-preferring VIP receptor (VIP2/PACAP receptor)
            mRNA, complete cds.
ACCESSION   L36566
NID         g550477
VERSION     L36566.1  GI:550477
KEYWORDS    PACAP receptor; VIP receptor; helodermin-preferring VIP receptor.
SOURCE      Homo sapiens cDNA to mRNA.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1640)
  AUTHORS   Svoboda,M., Tastenoy,M., Van Rampelbergh,J., Goossens,J.F., De
            Neef,P., Waelbroeck,M. and Robberecht,P.
  TITLE     Molecular cloning and functional characterization of a human VIP
            receptor from SUP-T1 lymphoblasts
  JOURNAL   Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (3), 1617-1624 (1994)
  MEDLINE   95110300
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1640
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_line="SUP T1 lymphoblast"
                     /clone_lib="lamda ZAP II"
     sig_peptide     163..231
                     /note="putative; putative"
     CDS             163..1479
                     /note="human VIP2 receptor was previously called
                     'helodermin-preferring VIP receptor'; transmembrane
                     domains are located at positions: 637-696; 772-844;
                     880-948; 1003-1071; 1147-1209; 1243-1302.; Potential
                     glycosylation sites are located at :334-336; 424-426;
                     436-438."
                     /codon_start=1
                     /function="VIP and PACAP receptor"
                     /protein_id="AAC37569.1"
                     /db_xref="PID:g550478"
                     /db_xref="GI:550478"
                     /translation="MRTLLPPALLTCWLLAPVNSIHPECRFHLEIQEEETKCTELLRS
                     QTEKHKACSGVWDNITCWRPANVGETVTVPCPKVFSNFYSKAGNISKNCTSDGWSETF
                     PDFVDACGYSDPEDESKITFYILVKAIYTLGYSVSLMSLATGSIILCLFRKLHCTRNY
                     IHLNLFLSFILRAISVLVKDDVLYSSSGTLHCPDQPSSWVGCKLSLVFLQYCIMANFF
                     WLLVEGLYLHTLLVAMLPPRRCFLAYLLIGWGLPTVCIGAWTAARLYLEDTGCWDTND
                     HSVPWWVIRIPILISIIVNFVLFISIIRILLQKLTSPDVGGNDQSQYKRLAKSTLLLI
                     PLFGVHYMVFAVFPISISSKYQILFELCLGSFQGLVVAVLYCFLNSEVQCELKRKWRS
                     RCPTPSASRDYRVCGSSFSHNGSEGALQFHRASRAQSFLQTETSVI"
     mat_peptide     232..1476
```

```
                     /function="VIP and PACAP receptor"
BASE COUNT      315 a    512 c    461 g    352 t
ORIGIN
        1 cgggacgagg gggcggcccc cgcgctcggg gcgctcggct acagctgcgg ggcccgaggt
       61 ctccgcgcac tcgctcccgg cccatgctgg aggcggcgga acccggggga cctaggacgg
      121 aggcggcggg cgctgggcgg cccccggcac gctgagctcg ggatgcggac gctgctgcct
      181 cccgcgctgc tgacctgctg gctgctcgcc cccgtgaaca gcattcaccc agaatgccga
      241 tttcatctgg aaatacagga ggaagaaaca aaatgtacag agcttctgag gtctcaaaca
      301 gaaaaacaca aagcctgcag tggcgtctgg gacaacatca cgtgctggcg gcctgccaat
      361 gtgggagaga ccgtcacggt gccctgccca aaagtcttca gcaattttta cagcaaagca
      421 ggaaacataa gcaaaaactg tacgagtgac ggatggtcag agacgttccc agatttcgtc
      481 gatgcctgtg gctacagcga cccggaggat gagagcaaga tcacgtttta tattctggtg
      541 aaggccattt ataccctggg ctacagtgtc tctctgatgt ctcttgcaac aggaagcata
      601 attctgtgcc tcttcaggaa gctgcactgc accaggaatt acatccacct gaacctgttc
      661 ctgtccttca tcctgagagc catctcagtg ctggtcaagg acgacgttct ctactccagc
      721 tctggcacgt tgcactgccc tgaccagcca tcctcctggg tgggctgcaa gctgagcctg
      781 gtcttcctgc agtactgcat catggccaac ttcttctggc tgctggtgga ggggctctac
      841 ctccacaccc tcctggtggc catgctcccc cctagaaggt gcttcctggc ctacctcctg
      901 atcggatggg gcctccccac cgtctgcatc ggtgcatgga ctgcggccag gctctactta
      961 gaagacaccg gttgctggga tacaaacgac cacagtgtgc cctggtgggt catacgaata
     1021 ccgattttaa tttccatcat cgtcaatttt gtcctttttca ttagtattat acgaattttg
     1081 ctgcagaagt taacatcccc agatgtcggc ggcaacgacc agtctcagta caagaggctg
     1141 gccaagtcca cgctcctgct tatcccgctg ttcggcgtcc actacatggt gtttgccgtg
     1201 tttcccatca gcatctcctc caaataccag atactgtttg agctgtgcct cgggtcgttc
     1261 cagggcctgg tggtggccgt cctctactgt ttcctgaaca gtgaggtgca gtgcgagctg
     1321 aagcgaaaat ggcgaagccg gtgcccgacc ccgtccgcga gccgggatta cagggtctgc
     1381 ggttcctcct tctcccacaa cggctcggag ggcgccctgc agttccaccg cgcgtcccga
     1441 gcccagtcct tcctgcaaac ggagacctcg gtcatctagc cccacccctg cctgtcggac
     1501 gcggcgggag gcccacggtt cggggcttct gcggggctga gacgccggct tcctccttcc
     1561 agatgcccga gcaccgtgtc gggcaggtca gcgcggtcct gactccgtca agctggttgt
     1621 ccactaaacc ccatacctgg
```

## ABBREVIATIONS

FSD = female sexual dysfunction
FSAD = female sexual arousal disorder

cAMP = cyclic adenosine-3',5'-monophosphate
cGMP = cyclic guanosine-3',5'-monophosphate

$P_{cAMP}$ = potentiator of cAMP
$P_{cGMP}$ = potentiator of cGMP

$A_{cAMP}$ = activator of cAMP
$A_{cGMP}$ = activator of cGMP

$AM_{cAMP}$ = adverse modulator of cAMP
$AM_{cGMP}$ = adverse modulator of cGMP

$I_{cAMP}$ = inhibitor of cAMP
$I_{cGMP}$ = inhibitor of cGMP
$I{:}I_{cAMP}$ = inhibitor of an inhibitor of cAMP
$I{:}I_{cGMP}$ = inhibitor of an inhibitor of cGMP
$I{:}AM_{cAMP}$ = inhibitor of an adverse modulator of cAMP
$I{:}AM_{cGMP}$ = inhibitor of an adverse modulator of cGMP
$U{:}A_{cAMP}$ = upregulator of activator of cAMP
$U{:}A_{cGMP}$ = upregulator of activator of cGMP

AC = adenylate cyclase
A:AC = activator of AC

NEP = neutral endopeptidase
I:NEP = inhibitor of NEP

VIP = vasoactive intestinal peptide
VIPr = receptor of VIP (may be expressed as VIPR)
$VIP_n$ = receptor sub-type of VIP (such as VIPR1, VIPR2)
A:VIPr = activator of VIPr
$A{:}VIP_n$ = activator of $VIP_n$

I:VIPr = inhibitor of VIPr

I:VIP$_n$ = inhibitor of VIP$_n$

I:I:VIPr = inhibitor of an inhibitor of VIPr

I:I:VIP$_n$ = inhibitor of an inhibitor of VIP$_n$

PDE = phosphodiesterase

PDEn = PDE family (e.g. PDE1, PDE2 etc.)

PDE$_{cAMP}$ = PDE capable of hydrolysing cAMP

PDE$_{cGMP}$ = PDE capable of hydrolysing cGMP

I:PDE$_{cAMP}$ = inhibitor of a PDE capable of hydrolysing cAMP

I:PDE$_{cAMP}$ = inhibitor of a PDE family capable of hydrolysing cAMP

NPY = neuropeptide Y

NPYr = receptor of NPY (may be expressed as NPYR)

NPY Y$_n$ = Y$_n$ receptor sub-type of NPY (e.g. NPY Y$_1$) (e.g. NPYR1)

I:NPY = inhibitor of NPY

I:NPY Y$_n$ = inhibitor of NPY Y$_n$

kDa = kilodalton

bp = base pair

kb = kilobase pair

## CLAIMS

1. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, preferably FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

2. A pharmaceutical composition according to claim 1 wherein the agent is a mediator of genital (e.g. vaginal or clitoral) vasorelaxation.

3. A pharmaceutical composition according to claim 1 or claim 2 wherein the composition is for oral administration.

4. A pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 3 wherein the said cAMP is endogenous cAMP.

5. A pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 4 wherein the composition is applied before or during sexual stimulation.

6. Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, preferably FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD.

7. Use according to claim 6 wherein the agent is a mediator of genital (e.g. vaginal or clitoral) vasorelaxation.

8. Use according to claim 6 or claim 7 wherein the medicament is for oral administration.

9. Use according to any one of claims 6 to 8 wherein the said cAMP is endogenous cAMP.

10. Use according to any one of claims 6 to 9 wherein the composition is applied before or during sexual stimulation.

11. A method of treating a female (such as a female suffering from FSD, preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

12. A method according to claim 11 wherein the agent is a mediator of genital (e.g. vaginal or clitoral) vasorelaxation.

13. A method according to claim 11 or claim 12 wherein the agent is orally administered.

14. A method according to any one of claims 11 to 13 wherein the said cAMP is endogenous cAMP.

15. A pharmaceutical composition according to any one of claims 11 to 14 wherein the composition is applied before or during sexual stimulation.

16. An assay method for identifying an agent that can be used to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: determining whether an agent can directly or indirectly potentiate cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

17. A process comprising the steps of:

(a) performing the assay according to claim 16;

(b) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP; and

(c) preparing a quantity of those one or more identified agents.

18. A method of treating FSD, preferably FSAD, by potentiating *in vivo* cAMP with an agent;

wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP in an *in vitro* assay method;

wherein the *in vitro* assay method is the assay method defined in claim 16.

19. Use of an agent in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of FSD, preferably FSAD, the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP when assayed *in vitro* by the assay method according to claim 16.

20. An agent identified by the assay method according to claim 16.

21. An agent according to claim 20 for use in medicine.

22. An agent according to claim 21 for use in treating FSD, preferably FSAD.

23. A medicament for oral administration to treat FSD, preferably FSAD, wherein the medicament comprises the agent according to claim 20.

24. A diagnostic method, the method comprising isolating a sample from a female; determining whether the sample contains an entity present in such an amount to cause FSD, preferably FSAD, or is in an amount so as to cause FSD, preferably FSAD; wherein the entity has a direct or indirect effect on the level or activity of cAMP in the sexual genitalia of the female.

25. A diagnostic composition or kit comprising means for detecting an entity in an isolated female sample; wherein the means can be used to determine whether the sample contains the entity and in such an amount to cause FSD, preferably FSAD, or is in an amount so as to cause FSD, preferably FSAD; wherein the entity has a direct or indirect effect on the level or activity of cAMP in the sexual genitalia of the female.

26. An animal model used to identify agents capable of treating FSD, preferably FSAD, said model comprising an anaesthetised female animal including means to measure changes in genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow of said animal following stimulation of the pelvic nerve thereof.

27. An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, preferably FSAD, the assay method comprising: administering an agent to the animal model of claim 26; and measuring any potentiation of cAMP and/or increase in blood flow in the genital (e.g. vaginal or clitoral) of said animal.

28. An agent identified by the assay method according to claim 27.

29. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD (preferably FSAD); the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

30. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD (preferably FSAD); and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

31. A method of treating a female suffering from FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

32. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

33. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

34. A method of treating a female for FSD (preferably FSAD) or to prevent FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

1593

35. The invention according to any one of claims 29 to 34 wherein said agent potentiates cAMP.

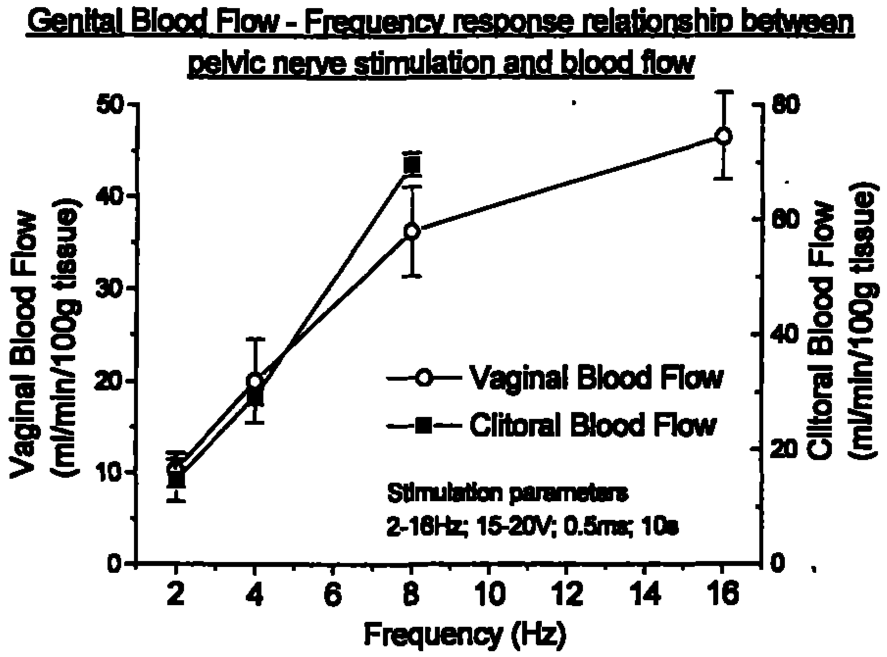
36. The invention according to any one of the preceding claims wherein said cAMP is endogenous cAMP (as defined herein).

## ABSTRACT

## PHARMACEUTICAL

A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD, is described. The method comprises delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female. The agent may be admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

Figure 1

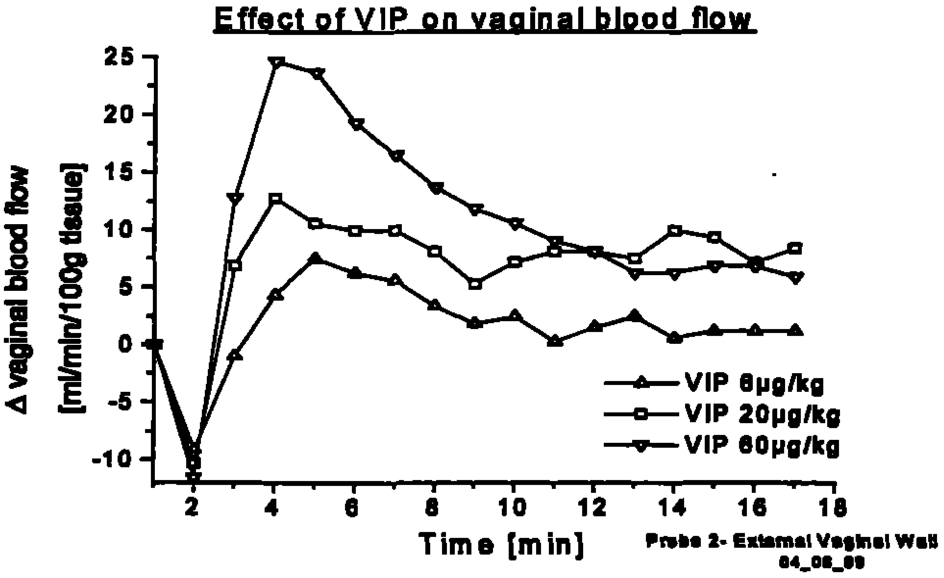


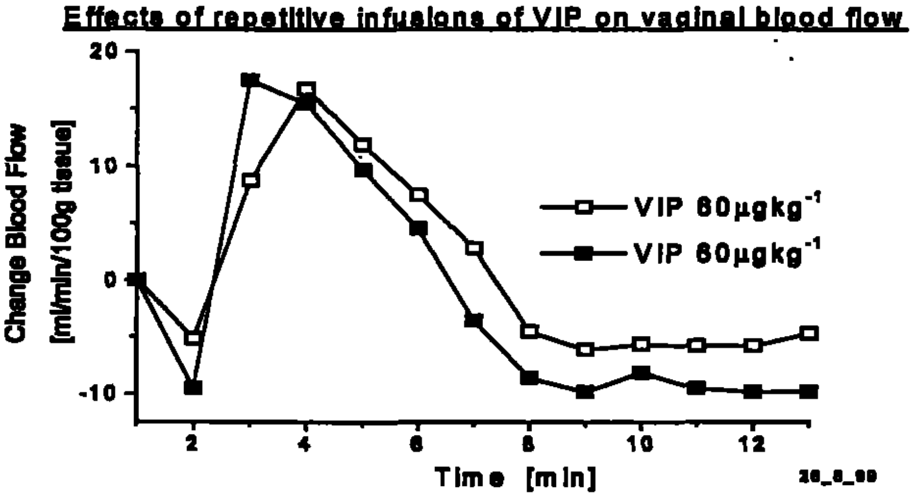
Genital Blood Flow - Frequency response relationship between pelvic nerve stimulation and blood flow

1595
15/06

Figure 2

a

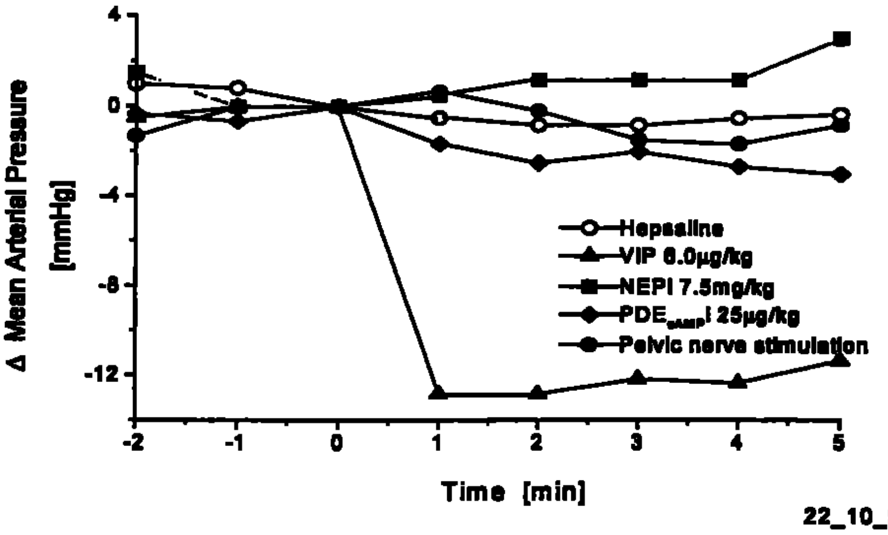




2b

p9326gb.doc

Figure 3

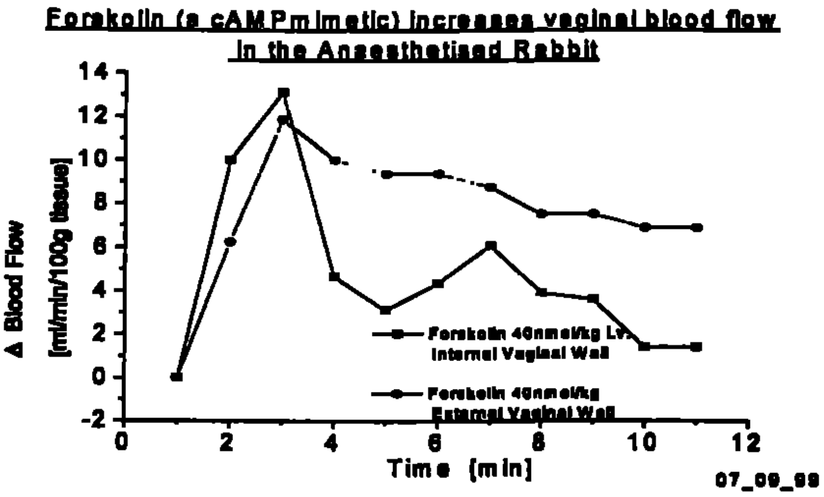


Effect of VIP, an NEP Inhibitor, a $PDE_{cAMP}$ Inhibitor or Pelvic Nerve Stimulation on Mean Arterial Pressure in the Anaesthetised Rabbit

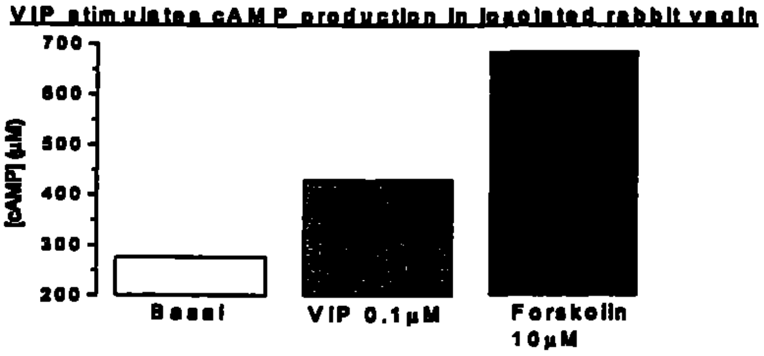
22_10_99

Figure 4

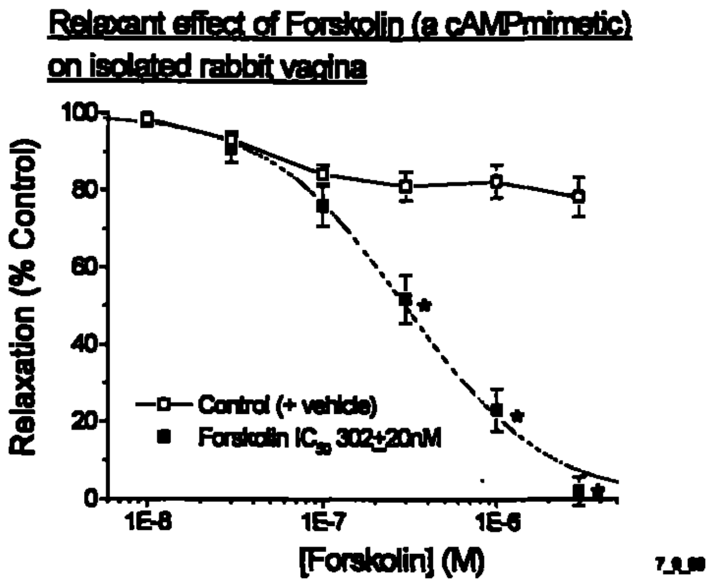
4a



)



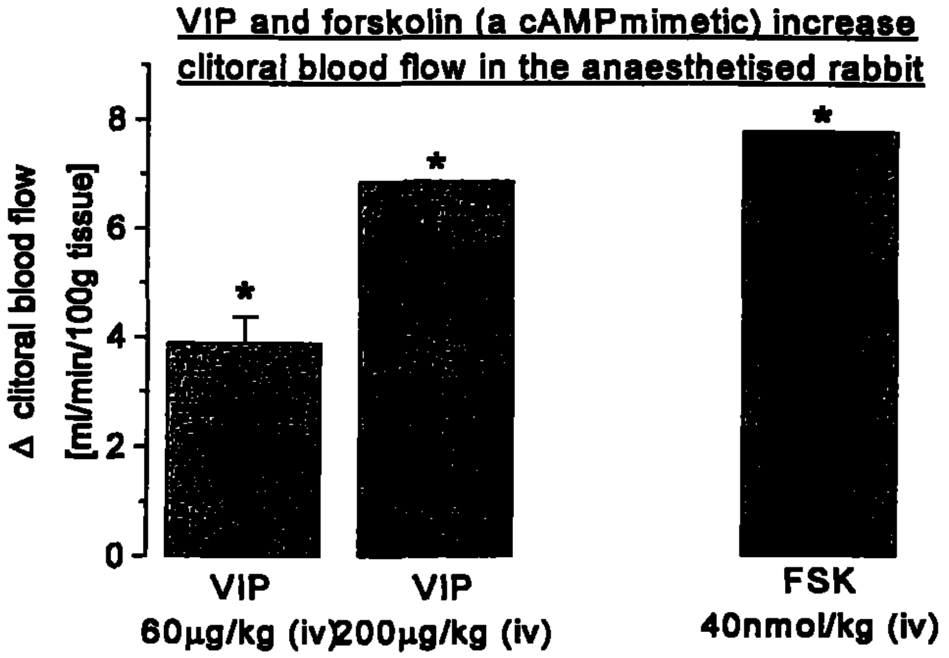
4b)



4c)

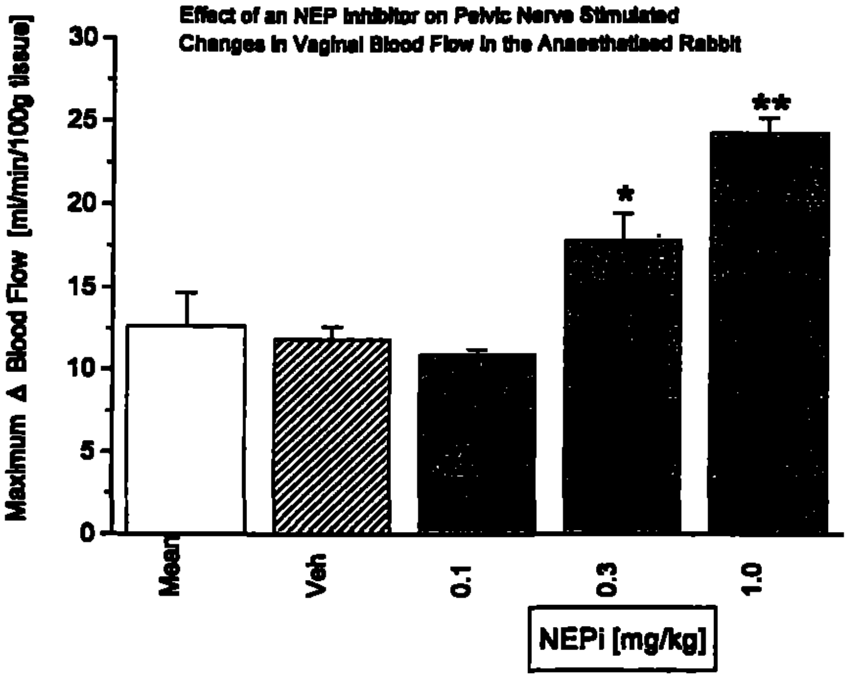
1598

Figure 5



1599
1600

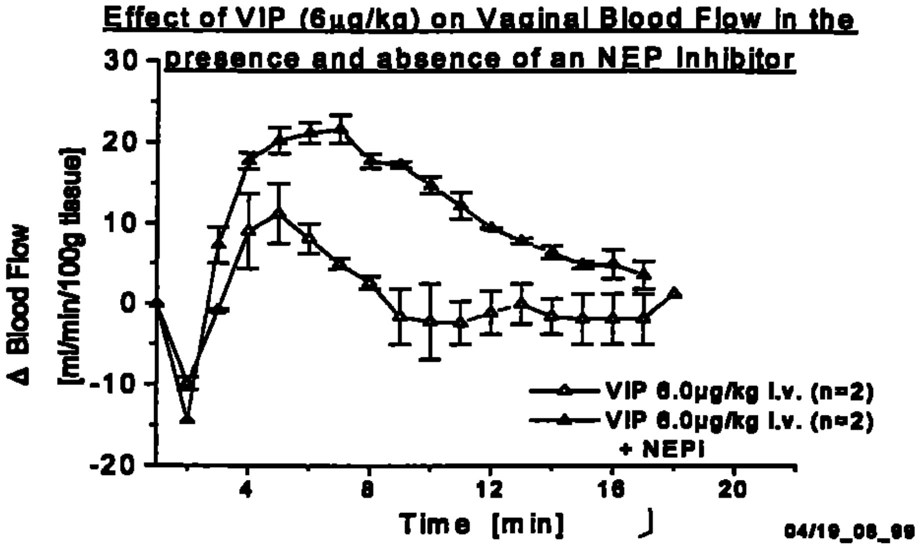
Figure 6

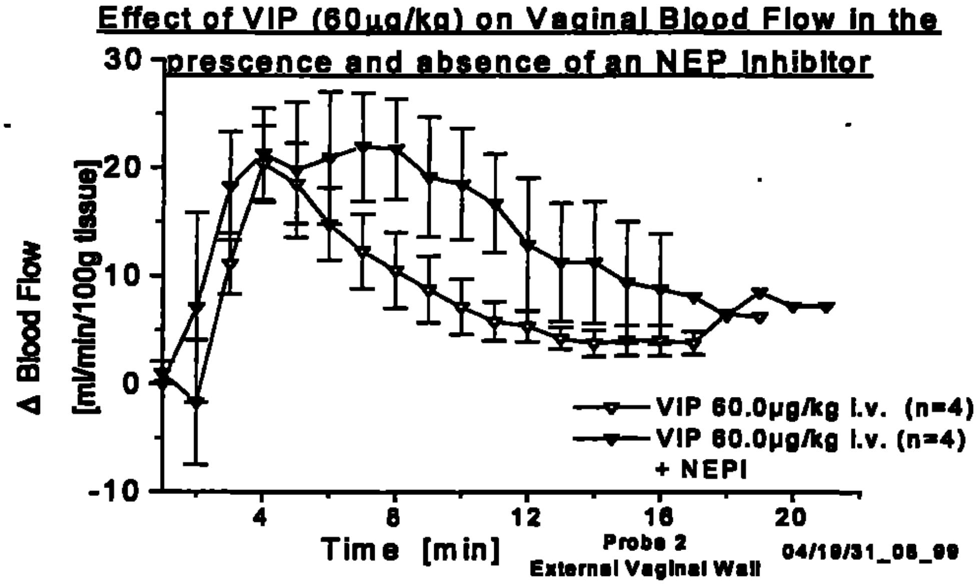


5

1600

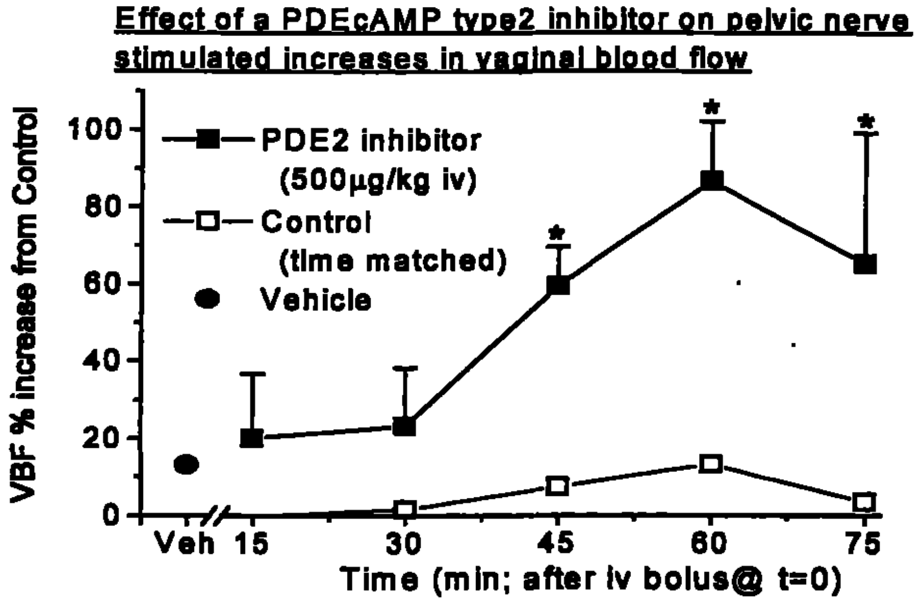
Figure 7





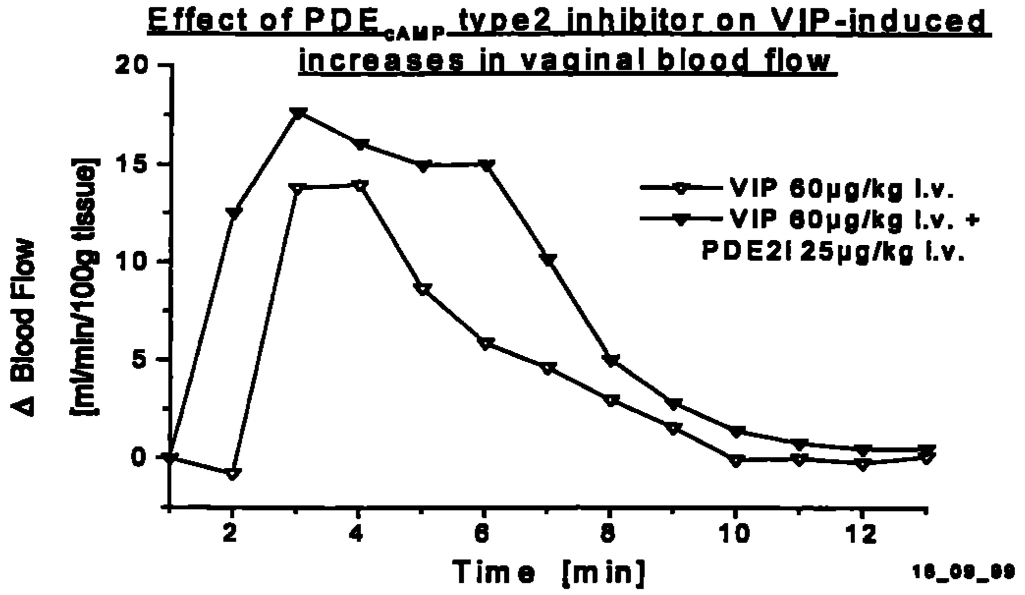
160)

Figure 8


Effect of a PDEcAMP type2 inhibitor on pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow
VBF % increase from Control
100
80
60
40
20
0
PDE2 inhibitor (500µg/kg iv)
Control (time matched)
Vehicle
*
*
*
Veh
15
30
45
60
75
Time (min; after iv bolus@ t=0)

1602 ~~1003~~

Figure 9



1603

Figure 10

5

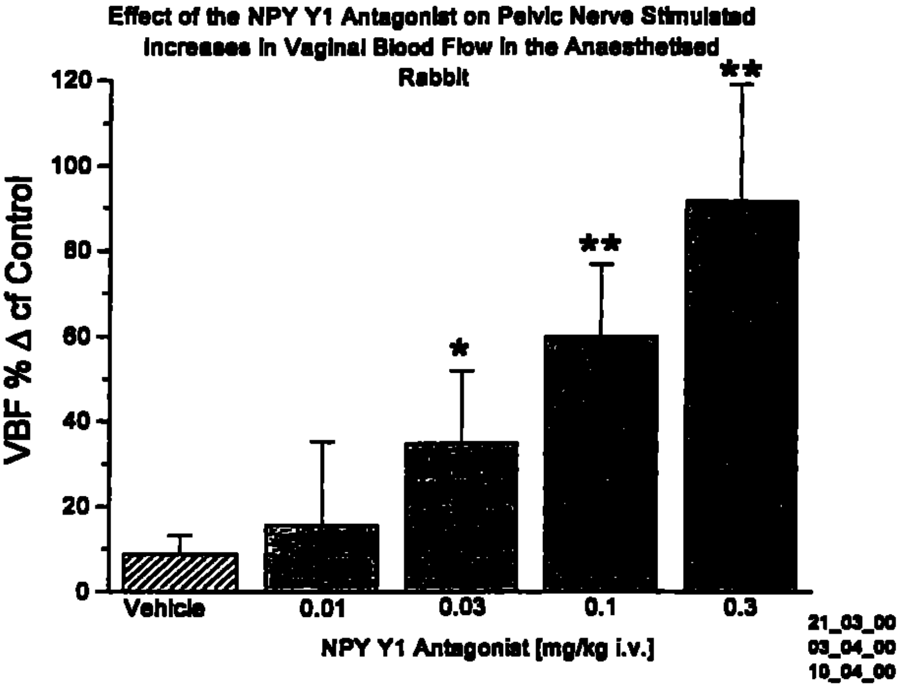
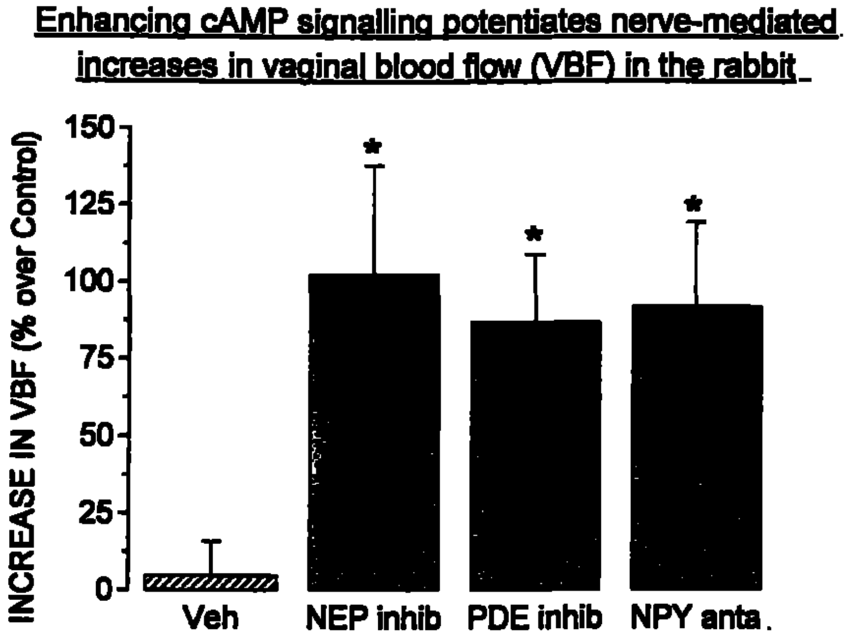


Figure 11


Enhancing cAMP signalling potentiates nerve-mediated increases in vaginal blood flow (VBF) in the rabbit
INCREASE IN VBF (% over Control)
150
125
100
75
50
25
0
*
*
*
Veh
NEP inhib
PDE inhib
NPY anta.

[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

# OFICINA DE PATENTES

Oficina de Patentes
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

El abajo firmante, siendo funcionario debidamente autorizado de acuerdo con la Sección 74(1) y (4) de la Ley de 1994 de Regulación y Contratación exterior, para firmar y expedir certificados por cuenta del Interventor General, certificó que, adjunto al presente documento se encuentra una copia exacta de los documentos presentados originalmente con relación a la solicitud de Patente identificada aquí.

Si, de acuerdo con las Normas de Patentes de 1.982 (Re-registro de Compañías) una compañía nombrada en el presente certificado y en cualesquiera documentos que lo acompañan ha sido re-registrada al amparo de la Ley de Sociedades de 1.980 con el mismo nombre con el cual había sido registrada inmediatamente antes de su re-registro salvo la sustitución, o la inclusión, como última parte del nombre, de las palabras "sociedad de responsabilidad limitada" o sus equivalentes en Galés, las referencias al nombre de la compañía en este certificado y en cualesquiera documentos que le acompañan deberán ser tratados como referencias al nombre con el cual esté re-registrada.

De acuerdo con las reglas, las palabras "sociedad a responsabilidad limitada" pueden ser sustituidas por p.l.c., plc. P.L.C. o PLC.

El re-registro bajo la Ley de Sociedades no constituye una nueva entidad legal sino que somete simplemente la sociedad a ciertas normas adicionales de la Ley de sociedades.

Firmado: Ilegible

Fecha: 2 agosto 2000

Agencia Ejecutiva del Ministerio de Comercio e Industria

IMPRESO 1/77
Ley de Patentes 1977
(Regla 16)

1606

1/77

## OFICINA DE PATENTES

**Solicitud de concesión de una patente**
**(ver las notas por detrás de este impreso.**
**También puede conseguir un folleto explicatorio**
**de la Oficina de Patentes para rellenar este impreso)**

**Oficina de Patentes**
**Cardiff Road**
**Newport**
**Gwent NP9 1RH**

---

1. Su referencia P009412GB CTH

---

2. Solicitud de patente número 0017141.3 12 JUL 2000
(La Oficina de Patentes rellenará este apartado)

---

3. Nombre completo, dirección y código postal del solicitante o solicitantes (subrayar los apellidos)

Pfizer Limited
Ramsgate Road
Sandwich
Kent
CT13 9NJ

Número de ADP (si se conoce) 6892673001

Si el solicitante el una empresa, indicar el país/estado de su incorporación REINO UNIDO

---

4. Título de la invención PRODUCTO FARMACÉUTICO

---

5. Nombre de su agente (si lo tiene)

"Dirección" en el Reino Unido donde debería enviarse toda la correspondencia. (incluyendo el códico postal)

D. YOUNG & CO
21 NEW FETTER LANE
LONDON
EC4A 1DA

Número de ADP (si lo conoce) 59006

---

6. Si va a declarar prioridad por una o más solicitudes de patentes anteriores, indice el país y la fecha de solicitud de cada una de las solicitudes anteriores (si lo conoce) y el número de solicitud de las mismas 1° 2° 3°

**País** **número de solicitud de prioridad** **(si lo conoce)** **Fecha** **(día/mes/año)**

[illegible] MORENO
[illegible] MADRID

1607

---

7. Si esta solicitud es una divisional o derivada de una solicitud británica anterior, indicar el número y fecha de la solicitud anterior

| Número de la solicitud anterior | Fecha de solicitud |
|---|---|
| | |

---

8. ¿Se requiere una declaración de inventor y de derecho de concesión de una patente para mantener esta petición? (responder si en caso: SI
   a) algún solicitante nombrado en el apartado 3 no es un inventor, o
   b) hay un inventor quien es nombrado como un solicitante, o
   c) algún solicitante nombrado es una empresa
   Ver nota (d)

---

9. Poner el número de páginas para cada uno de los siguientes requisitos que está solicitando en este impreso.
No contar copias del mismo documento

| | |
|---|---|
| Hojas de continuación de este impreso | 0 |
| Descripción | 205 (incluye Listado de Secuencias) |
| Reivindicaciones | 5 |
| Resumen | 1 |
| Dibujos | 12 |

---

10. Si también está solicitando alguna de las siguientes, declare cuantos de cada requisito.

| | |
|---|---|
| Documentos de Prioridad | 0 |
| Traducción de los Documentos de Prioridad | 0 |
| Declaración de los inventores y derecho de concesión de una patente (impreso de patente 1/77) | 0 |
| Solicitud de examen preliminar y búsqueda (impreso de patente 1/77) | 0 |
| Solicitud de examen substantivo (impreso de patente 1/77) | 0 |
| Otros documentos (especificar) | 0 |

[illegible] Teléf. [illegible]

1608

---

11. Solicitamos la concesión de una patente basada ne esta solicitud
Firma ilegible Fecha 12 de julio 2000
D YOUNG & CO
Agentes de los solicitantes

---

12. Nombre y número de teléfono de la persona de contacto en el Reino Unido — Charles Harding 023 80634816

---

**Advertencia**
Despues de haber sido presentada una solicitud de Patente, el Interventor de la Oficina de Patentes estudiará si la publicación o la comunicación de la invención ha de ser prohibida o restringida de acuerdo con la Sección 22 de la Ley de Patentes de 1.997, y dará a conocer al solicitante si esta prohibición o esta restricción es necesaria. Se recuerda igualmente a los solicitantes que residen en el Reino Unido que las solicitudes no pueden ser presentadas fuera del país sin autorización escrita a no ser que una solicitud haya sido presentada en un plazo no inferior a 6 semanas, anteriormente, en el Reino Unido para una patente relacionada con la misma invención y si no se les ha dado ninguna instrucción prohibiendo la publicación o la comunicación o la revocación de esta instrucción.

**Notas**
a) Si usted necesita ayuda para rellenar este impreso o tiene alguna pregunta, por favor póngase en contacto con la Oficina de Patentes en 0645 500505
b) Sírvanse escribir a máquina, o con tinta negra utilizando letras mayúsculas. Una
c) Si no hay suficiente espacio para todos los detalles pertinentes en cualquier apartado de este impreso, por favor continúe en hoja aparte y escriba "ver hoja complementaria" en la parte(s) pertinente. Cualquier hoja complementaria debería adjuntarse a este impreso.
d) Si usted ha contestado "Si" necesitará rellenar el impreso de patente 7/77.
f) Para los detalles de la tasa y forma de pago, sírvanse consultar la Oficina de Patentes

**Impreso de Patentes 1/77**

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
Teléf. [illegible] ADRID

# PRODUCTO FARMACEUTICO

## AMBITO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un producto farmacéutico que es útil para el tratamiento de la disfunción sexual femenina (FSD), en particular de trastornos de la excitación sexual femenina (FSAD).

La presente invención se refiere también a un procedimiento de tratamiento de la FSD, en particular de la FSAD.

La presente invención se refiere también a ensayos para rastrear compuestos útiles en el tratamiento de la FSD, en particular de la FSAD.

Por conveniencia, se presenta una lista de las abreviaturas que se utilizan en el siguiente texto antes de la sección de reivindicaciones.

## RESPUESTA SEXUAL FEMENINA

La fase de excitación de la respuesta sexual femenina no se distingue fácilmente de la fase de deseo hasta que empiezan a tener lugar cambios fisiológicos en la vagina y clítoris así como en otros órganos sexuales. La excitación y placer sexuales están acompañados de una

[illegible] MORENO
[illegible]
Telé. [illegible] MADRID

combinación de eventos vasculares y neuromusculares que conducen a la congestión del clítoris, labios y pared vaginal, a un aumento de la lubricación vaginal y de la dilatación del lumen vaginal (Levin, 1980, Ottesen, 1983, Levin, 1991, Levin, 1992, Sjoberg, 1992, Wagner, 1992, Schiavi et al., 1995, Masters et al., 1996, Berman et al., 1999).

La congestión vaginal posibilita que tenga lugar la trasudación, y este proceso es responsable del aumento de la lubricación vaginal. La trasudación permite un flujo de plasma a través del epitelio sobre la superficie de la vagina, cuya fuerza motriz es el aumento del flujo sanguíneo en el lecho capilar vaginal durante el estado excitado. Además, la congestión conduce a un aumento de la longitud vaginal y del diámetro luminal, especialmente en los dos tercios distales del canal vaginal. La dilatación luminal de la vagina se debe a una combinación de la relajación del músculo liso de esta pared y la relajación del músculo esquelético de los músculos del suelo pélvico. Algunos trastornos de dolor sexual, como el vaginismo, se piensa que son debidos, al menos en parte, a una inadecuada relajación que evita la dilatación de la vagina, todavía debe determinarse si este es un problema principalmente del músculo liso o del esquelético. (Levin, 1980, Ottesen,

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

1983, Levin, 1991, Sjoberg, 1992, Wagner, 1992, Schiavi et al., 1995, Master et al., 1996, Berman et al., 1999).

La vasculatura y microvasculatura de la vagina están inervadas por nervios que contienen neuropéptidos y otros candidatos a neurotransmisores. Estos incluyen el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), el neuropéptido Y (NPY), la óxido nítrico sintasa (NOS), la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), (Hoyle et al., 1996). Los péptidos que están presentes en el clítoris se discuten a continuación. La óxido nítrico sintasa, que se localiza a menudo con el VIP, muestra una mayor expresión, inmunológicamente, en las arterias y venas profundas que en los vasos sanguíneos propios (Hoyle et al., 1996).

## DISFUNCION SEXUAL FEMENINA

Se sabe que algunos individuos pueden sufrir disfunción sexual femenina (FSD).

La FSD se define como la dificultad o incapacidad de una mujer para encontrar satisfación en la expresión sexual. La FSD es un término colectivo para varios trastornos sexuales femeninos (Leiblum, 1998, Berman et al., 1999). La mujer puede tener falta de deseo, dificultad con la

PATRICIA [illegible] MORENO
ING. [illegible]AN
[illegible] 113
Teléf. [illegible] MADRID

excitación o el orgasmo, dolor en el coito o una combinación de estos problemas. Algunos tipos de enfermedades, medicaciones, heridas o problemas psicológicos pueden producir la FSD.

Los estudios que investigan la disfunción sexual en parejas revelan que hasta el 76% de las mujeres padecen disfunción sexual y que el 30-50% de las mujeres de los EE.UU. ha experimentado la FSD.

Los subtipos de la FSD incluyen: trastorno del deseo sexual hipoactivo, trastorno de la excitación sexual femenina, trastornos orgásmicos y trastorno del deseo sexual.

Los tratamientos en desarrollo están dirigidos a tratar subtipos específicos de la FSD, predominantemente los trastornos del deseo y de la excitación.

Las categorías de la FSD se definen mejor por contraste con las fases de la respuesta sexual femenina normal: deseo, excitación y orgasmo (Leiblum, 1998). El deseo o líbido es el motor de la expresión sexual, y sus manifestaciones incluyen a menudo pensamientos sexuales junto con un compañero interesado o al exponerse a otros estímulos sexuales. En contraposición, la excitación sexual es la

PAT[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
Teléf. [illegible]

respuesta vascular a la estimulación sexual, un componente importante de la cual es la lubricación vaginal y la elongación de la vagina. De esta manera, la excitación sexual, en contraposición con el deseo sexual, es una respuesta relativa al flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal y clitorídeo) y no necesariamente a la sensibilidad. El orgasmo es la liberación de la tensión sexual que ha culminado durante la excitación.

Por ello, la FSD aparece típicamente cuando una mujer tiene una respuesta inadecuada o insatisfactoria en cualquiera de estas fases, habitualmente deseo, excitación u orgasmo. Las categorías de la FSD incluyen: trastorno del deseo sexual hipoactivo, trastorno de la excitación sexual, trastornos orgásmicos y trastornos de dolor sexual.

El trastorno del deseo sexual hipoactivo está presente si una mujer no tiene deseo, o tiene poco, de ser sexual, y no tiene pensamientos o fantasías sexuales, o tiene pocos. Este tipo de FSD puede producirse por niveles bajos de testosterona, debidos a la menopausia natural o a la menopausia quirúrgica. Otras causas incluyen enfermedad, medicaciones, fatiga, depresión y ansiedad.

El trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) se

PATRICIA [illegible] MORENO
MADRID

caracteriza por una respuesta genital inadecuada a la estimulación sexual. Los genitales (por ejemplo vagina y/o clítoris) no experimentan la congestión que caracteriza a la excitación sexual normal. Las paredes vaginales están poco lubricadas, de modo que el coito es doloroso. Los orgasmos pueden estar imposibilitados. El trastorno de la excitación puede estar producido por una reducción de estrógenos en la menopausia o después de un parto y durante la lactancia, así como por enfermedad, con componentes vasculares como diabetes y aterosclerosis. Otras causas son resultado del tratamiento con agentes diuréticos, antihistamínicos, antidepresivos, por ejemplo SSRI, o antihipertensivos. El FSAD se discute con más detalle a a continuación.

Los trastornos de dolor sexual (que incluyen dispareunia y vaginismo) se caracterizan por dolor como resultado de la penetración y pueden estar causados por medicaciones que reducen la lubricación, endometriosis, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad intestinal inflamatoria o problemas del tracto urinario.

La prevalencia de la FSD es difícil de calibrar debido a que el término cubre varios tipos de problemas, algunos de los cuales son difíciles de medir, y debido a que el

PATRICIA [illegible] MORENO
INGL[illegible] [illegible]
C. [illegible] MADRID
Teléf. 51[illegible]

interés por tratar la FSD es relativamente reciente. Muchos problemas sexuales de las mujeres están asociados directamente al proceso de envejecimiento femenino o a enfermedades crónicas como diabetes e hipertensión.

Existen amplias variaciones en la incidencia y prevalencia comunicadas de la FSD descritas, explicadas en parte por el uso de criterios de evaluación diferentes, pero la mayoría de los investigadores comunica que una proporción significativa de mujeres por lo demás sanas tiene síntomas de uno o más de los subgrupos FSD. Como ejemplo, los estudios que comparan la disfunción sexual en parejas revelan que el 63% de las mujeres tienen disfunción de la excitación o del orgasmo, comparado con el 40% de los hombres que tienen disfunción eréctil o eyaculatoria (Frank et al., 1978).

Sin embargo, la prevalencia del trastorno de la excitación sexual femenina varía considerablemente de estudio a estudio. En un reciente estudio de National Health and Social Life, el 19% de las mujeres comunicaron dificultades de lubricación, mientras que el 14% de las mujeres pacientes ambulatorios de una clínica ginecológica comunicaron dificultades similares con la lubricación (Rosen et al., 1993).

PATRICIA ... MORENO
INGE... ... AN
... MADRID
Teléf. ...

1616

Varios estudios han informado también acerca de disfunción de la excitación sexual en mujeres diabéticas (hasta un 47%), incluyendo la reducción de la lubricación vaginal (Wincze et al., 1993). No hubo asociación entre neuropatía y disfunción sexual.

Numerosos estudios han mostrado también que entre un 11-48% de mujeres en conjunto pueden tener un deseo sexual reducido con la edad. De forma similar, entre 11-50% de las mujeres comunican problemas con la excitación y la lubricación, y por lo tanto experimentan dolor en el coito. El vaginismo es menos común, afectando aproximadamente al 1% de las mujeres.

Los estudios de mujeres sexualmente experimentadas han detallado que el 5-10% tienen anorgasmia primaria. Otro 10% tiene orgasmos infrecuentes y otro 10% los experimenta inconsistentemente (Spector et al., 1990).

Debido a que la FSD consiste en varios subtipos que expresan síntomas en fases separadas del ciclo de respuesta sexual, no hay una terápia única. El tratamiento actual de la FSD se enfoca principalmente a temas psicológicos y de relación. El tratamiento de la FSD evoluciona gradualmente según se dedican más estudios clínicos y de ciencia básica

[illegible]
[illegible] na, 113
Telef. [illegible] 90 - MADRID

a la investigación de este problema médico. Las dolencias sexuales femeninas no son todas psicológicas en su patofisiología, especialmente para aquellos individuos que pueden tener un componente de disfunción vasculogénica (por ejemplo FSAD) que contribuye a la dolencia sexual femenina en conjunto. No existen actualmente medicamentos autorizados para el tratamiento de la FSD. La terapia de medicamentos empírica incluye la administración de estrógenos (tópicamente o en forma de una terapia de sustitución hormonal), andrógenos o medicamentos de alteración del ánimo como buspirona o trazodona. Estas opciones de tratamiento a menudo son insatisfactorias debido a la baja eficacia o a efectos secundarios inaceptables.

Puesto que el interés en tratar la FSD farmacológicamente es relativamente reciente, la terapia consiste en lo siguiente: consejo psicológico, lubricantes sexuales sin receta médica y candidatos investigacionales, incluyendo medicamentos aprobados para otras dolencias. Estos medicamentos consisten en agentes hormonales, testosterona o combinaciones de estrógeno y testosterona, y más recientemente, medicamentos vasculares, que se han mostrado eficaces en la disfunción eréctil masculina. Ninguno de estos agentes ha demostrado ser muy eficaz para tratar la

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/ Cartagena, 113
Teléf. [illegible] - MADRID

FSD.

TRASTORNO DE LA EXCITACION SEXUAL FEMENINA (FSAD)

La respuesta de excitación sexual consiste en la vasocongestión de la pelvis, la lubricación vaginal y la expansión y tumefacción de los genitales externos. Su alteración produce una notable tensión y/o dificultades interpersonales. Los estudios que han investigado la disfunción sexual en parejas revelan que existe un gran número de mujeres que sufren disfunción de la excitación sexual, conocida también como trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD).

El manual de diagnóstico y estadística (DSM) IV de la Asociación Psiquiátrica Americana define el trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) como:

> *"una incapacidad persistente o recurrente para alcanzar o mantener hasta la terminación de la actividad sexual una respuesta adecuada de lubricación-tumefacción de la excitación sexual. La alteración produce una notable tensión o dificultades interpersonales."*

PATRICIA ... MORENO
ING... Y ... AN
... 113
... MADRID
Telé...

El FSAD es un trastorno sexual altamente prevalente que afecta a mujeres pré, peri- y postmenopáusicas (±HRT). Está asociado a trastornos concomitantes como depresión, enfermedades cardiovasculares, diabetes y trastornos UG.

Las consecuencias primarias del FSAD son la falta de congestión/tumefacción, falta de lubricación y falta de sensación genital placentera. Las consecuencias secundarias del FSAD son una reducción del deseo sexual, dolor durante el coito y dificultades para conseguir un orgasmo.

Recientemente se ha hipotetizado que existe una base vascular para al menos una parte de las pacientes con síntomas del FSAD (Goldstein et al., 1998) con datos animales que apoyan esta perspectiva (Park et al., 1997).

Los medicamentos candidatos para el tratamiento del FSAD, en los que se está investigando su eficacia, son principalmente terapias de disfunción eréctil que potencian la circulación en los genitales masculinos. Consisten en dos tipos de formulación: medicación oral o sublingual (apomorfina, fentolamina, sildenafilo), y prostaglandina (PGE$_1$-Alprostadil) que se inyecta o administra transuretralmente en hombres, y tópicamente en los genitales de las mujeres.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
c [illegible] 13
[illegible] MADRID
Telef. [illegible]

La presente invención trata de proporcionar un medio eficaz de tratamiento de la FSD, y en particular del FSAD.

## ASPECTOS DEL SUMARIO DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se basa en los descubrimientos según lso cuales el FSAD está asociado a una reducción del flujo sanguíneo genital, en particular la reducción del flujo sanguíneo en la vagina y/o clítoris. Por ello, el tratamiento de mujeres con FSAD puede llevarse a cabo por estimulación del flujo sanguíneo genital con agentes vasoactivos. En los estudios de los presentes autores, se ha mostrado que el cAMP media la vasorrelajación vaginal y clitorídea y que el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal y clitorídeo) puede estimularse/potenciarse por elevación de los niveles de cAMP. Este es el descubrimiento base.

A este respecto, nadie ha propuesto anteriormente que el FSAD pueda tratarse de tal manera, es decir por elevación directa o indirecta de los niveles de cAMP. Además, no hay explicaciones en la técnica que sugieran que el FSAD estaba asociado a una modulación perjudicial de la actividad y/o niveles de cAMP o que el cAMP es responsable de la mediación de la vasorrelajación vaginal y clitorídea. Por

PATRICIA KOCH MORENO
[illegible]
MADRID

ello, la presente invención es aún más sorprendente.

Además, se ha encontrado que utilizando los agentes de la presente invención es posible aumentar la congestión genital y tratar el FSAD, por ejemplo por aumento de la lubricación en la vagina y por aumento de la sensibilidad en vagina y clítoris.

Por ello, en un aspecto amplio, la presente invención se refiere al uso de un potenciador de cAMP para tratar la FSD, en particular el FSAD.

La presente invención es ventajosa porque proporciona un medio para restablecer una respuesta de excitación sexual normal, es decir un aumento del flujo sanguíneo genital que conduce a la congestión vaginal, clitorídea y labial. Esto resultará en un aumento de la lubricación vaginal por trasudación de plasma, un aumento de la flexibilidad vaginal y un aumento de la sensibilidad genital (por ejemplo vaginal y clitorídea). Por ello, la presente invención proporciona un medio para restablecer, o potenciar, la respuesta de excitación sexual normal.

PATRICIA KOCH MORENO
INGLÉS Y ... AN
... RID

## ASPECTOS DETALLADOS DE LA PRESENTE INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una mujer que sufre FSD, en particular del FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En este caso, la composición (como cualquiera de las demás composiciones mencionadas en la presente) puede estar envasada para uso posterior en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, siendo.capaz el agente de potenciar cAMP en los genitales de una hembra que sufre FSD, en particular del FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento el

PATRICIA KOCH MORENO

suministro a la hembra de un agente que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la mujer, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD.

Como ejemplo, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar cAMP directa o indirectamente para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto un agente con un resto capaz de afectar la actividad y/o niveles de cAMP, y medir la actividad y/o niveles de cAMP, siendo una potenciación del cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la

PATRICIA ROCH MORENO
INGLÉS Y ... MAN
...RID
Telé...

FSD, en particular del FSAD.

Como otro ejemplo, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar cAMP directa o indirectamente para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto un agente con cAMP, y medir la actividad de cAMP, siendo una potenciación del cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de: (a) realizar el ensayo según la presente invención, (b) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente la actividad de cAMP y (c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados.

En este aspecto, el agente identificado en la etapa (b) puede modificarse de modo que, por ejemplo, se maximice la actividad y después puede repetirse la etapa (a). Estas etapas pueden repetirse hasta que se alcance la actividad o perfil farmacocinético deseado.

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID

Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de (a1) realizar el ensayo según la presente invención, (b1) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente la actividad de cAMP, (b2) modificar uno o más de los citados gentes identificados, (a2) repetir opcionalmente la etapa (a1) y (c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, por potenciación in vivo de cAMP con un agente, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP en un procedimiento de ensayo in vitro, siendo el procedimiento de ensayo in vitro el procedimiento de ensayo según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP al ensayarlo in vitro mediante el procedimiento de ensayo según la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
MADRID
Teléf.

modelo animal utilizado para identificar agentes capaces de tratar la FSD (en particular del FSAD), comprendiendo el citado modelo un animal hembra anestesiado incluyendo los medios para medir cambios en el flujo sanguíneo vaginal y/o clitorídeo del citado animal después de la estimulación del nervio pélvico de éste.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar la FSD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: administrar un agente al modelo animal de la presente invención y medir cualquier potenciación de cAMP y/o cualquier aumento del flujo sanguíneo en la vagina y/o clítoris del citado animal.

Para facilitar la referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se discuten ahora en los encabezados de sección apropiados. Sin embargo, las explicaciones de cada sección no están limitadas necesariamente a cada sección particular.

## ASPECTOS PREFERIDOS

Preferiblemente el agente es para el tratamiento de FSAD.

PATRICIA KOCH MORENO

Preferiblemente el agente es un mediador de la vasorrelajación genital (por ejemplo vaginal o clitorídea).

En una realización, el agente es preferiblemente para administración oral.

En otra realización, el agente puede ser para administración tópica.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un efecto potenciador sobre cAMP. Ejemplos de dichos agentes incluyen I:NEP y/o I:NPY. Expresado como alternativa, para algunas aplicaciones el agente no tiene preferiblemente un efecto potenciador directo sobre cAMP. Se comprende que el agente puede tener un efecto potenciador indirecto sobre cAMP al actuar sobre los agentes de actuación directa de origen y localización natural, como los VIP de origen y localización natural.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un efecto potenciador directo sobre cAMP. Ejemplos de dichos agentes incluyen I:PDE.

Para algunas aplicaciones el agente de la presente invención puede administrarse junto con otro agente

PATRICIA [illegible] MORENO
RID

farmacéuticamente activo. En ese caso la coadministración no tiene porqué hacerse a la vez, sino tan sólo por la misma vía. Un ejemplo de composición de coadministración podría ser una composición que comprende un agente según la presente invención y un agente adicional, pudiendo tener el agente adicional un efecto potenciador directo sobre cAMP. Los ejemplos de combinación se discuten a continuación.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un inhibidor, es decir, es capaz de exhibir una función inhibidora.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:PDE (a veces escrito como PDEI), más preferiblemente un I:PDEII (a veces escrito como I:PDE2 o PDEIIi o PDE2i).

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NEP (a veces escrito como NEPi).

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NPY (a veces escrito como NPYi).

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:PDEII selectivo.

PATRICIA KOCH MORENO

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NEP selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente es preferiblemente un I:NPY selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente preferiblemente no produce, o es administrado de forma que no lo produzca, una caída prolongada de la presión sanguínea (por ejemplo durante un periodo de aproximadamente 5 minutos o más). En esta realización, si el agente se administra tópicamente, entonces dicho agente puede tener la capacidad de producir una caída de la presión sanguínea (como si se suministrase por vía intravenosa), siempre que en la aplicación tópica pasen unos niveles mínimos de agente al torrente sanguíneo. Para un agente oral se prefiere que el agente no produzca una caída prolongada de la presión sanguínea.

En un aspecto preferido el agente no produce, o es administrado de forma que no produzca, un gran cambio en el ritmo cardiaco.

## TRATAMIENTO

Se apreciará que todas las referencias al tratamiento en

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID
Telf.

la presente incluyen uno o más de: tratamiento curativo, paliativo o profiláctico. Preferiblemente el término tratamiento incluye al menos tratamiento curativo y/o tratamiento paliativo.

## GENITALES FEMENINOS

El término "genitales femeninos" se utiliza según la definición proporcionada en Anatomy de Gray, C.D. Clemente, 13ª edición americana, a saber:

> "*Los órganos genitales consisten en un grupo interno y otro externo. Los órganos internos están situados en la pelvis y consisten en ovarios, conductos uterinos, útero y vagina. Los órganos externos son superficiales respecto al diafragma urogenital y por debajo del arco pélvico. Comprenden el monte de Venus, los labios mayores y menores, el clítoris, el vestíbulo, el bulbo del vestíbulo y las glándulas vestibulares mayores.*"

## cAMP ENDOGENO

En una realización altamente preferida, el agente de la presente invención potencia el cAMP endógeno, de modo que

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] RID

potencia los niveles de cAMP endógeno.

En este caso, el término "cAMP endógeno" significa cAMP que se origina por la estimulación sexual (excitación sexual). Por ello, el término no comprende los niveles de cAMP que sean elevados independientemente del impulso sexual.

De esta manera, según la presente invención, se consigue el tratamiento de FSAD por potenciación directa o indirecta de la señalización de cAMP endógeno lo que, a su vez, aumenta el flujo sanguíneo/lubricación vaginal y/o el flujo sanguíneo clitorídeo, potenciando así la respuesta excitatoria sexual natural. De esta manera, el procedimiento de tratamiento de la presente invención restablece o potencia la respuesta excitatoria normal. En el procedimiento de tratamiento de la presente invención puede conseguirse este resultado mediante el uso de un inhibidor de NEP (EC 3.4.24.11) o un inhibidor de PDE hidrolizante de cAMP o un antagonista del receptor de NPY.

Se proporciona un modelo de ensayo animal en la presente. Este modelo de ensayo animal puede utilizarse para determinar aumentos del flujo sanguíneo genital como resultado de la potenciación de cAMP. En este modelo animal se estimula un nervio pélvico, que produce un efecto que

PATRICIA [illegible] MORENO
ING. [illegible] MAN
[illegible] 113
Tel. [illegible] MADRID

imita la fisiología de una respuesta/excitación sexual. En estos experimentos, los agentes según la invención producen un aumento del flujo sanguíneo después de haber estimulado el nervio. En ausencia de estimulación, los agentes no tiene efecto (o es despreciable) en la producción de un aumento del flujo sanguíneo. Típicamente, en estos experimentos se estimula el nervio para obtener un aumento de la línea base del flujo sanguíneo. Después se suministra un agente candidato (o real) al animal sistémica o localmente, tal como por vía intravenosa, tópica u oral. Un aumento del flujo sanguíneo, comparado con los aumentos de control, es indicativo entonces de un agente según la presente invención.

## ESTIMULACION SEXUAL

La presente invención comprende también la administración del agente de la presente invención antes y/o durante la estimulación sexual. En este caso el término "estimulación sexual" puede ser sinónimo del término "excitación sexual". Este aspecto de la presente invención es ventajoso porque proporciona selectividad sistémica. La cascada natural aparece sólo en los genitales y no en otras localizaciones, por ejemplo en el corazón, etc. Por ello sería posible conseguir un efecto selectivo sobre los genitales.

PATRICIA HOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
[illegible], 113
[illegible] MADRID
Telf: [illegible]

De esta manera, para algunos aspectos de la presente invención es altamente deseable que exista una etapa de estimulación sexual. Se ha encontrado que esta etapa puede proporcionar selectividad sistémica. En este caso, "estimulación sexual" puede ser una o más de: estimulación visual, estimulación física, estimulación auditiva o estimulación de pensamiento.

De esta manera, los agentes de la presente invención se suministran antes o durante la estimulación sexual, particularmente cuando dichos agentes son de administración oral.

Por ello, para este aspecto preferido, la presente invención proporciona el uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado medicamento.

Preferiblemente, la presente invención proporciona el uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSAF, siendo el agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre

PATENTES [illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
MADRID
Tel. [illegible]

FSAD, siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado medicamento y siendo suministrado el citado medicamento oralmente a la citada hembra.

Además, para este aspecto preferido, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado agente.

Preferiblemente la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente

PATRICIA NEGRI MORENO
INGLES Y ALEMAN
nº 113
MADRID
Telf.

aceptable, siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado agente, y siendo suministrado el citado agente oralmente a la citada hembra.

POTENCIACION de cAMP

Como se utiliza en la presente con referencia al cAMP, el término "potenciación" incluye cualquiera de: aumento de la eficacia de cAMP, aumento de los niveles de cAMP, aumento de la actividad de cAMP, reducción del nivel de la degradación de cAMP, reducción del nivel de inhibición de cAMP.

El efecto potenciador puede ser un efecto directo. Un ejemplo de efecto directo sería la sobrerregulación de los niveles de cAMP por un agente que aumenta la expresión de éste.

Como alternativa, el efecto potenciador podría ser un efecto indirecto. Un ejemplo de dicho efecto sería la acción sobre una sustancia que, de otra manera, inhibiría y/o reduciría los niveles y/o actividad de cAMP. Otro ejemplo de dicho efecto sería el aumento de la acción de una sustancia que aumenta la eficacia de cAMP, aumenta los

PATRICIA MOREN MORENO
[illegible] AN
[illegible] 3
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

niveles de cAMP, aumenta la actividad de CAMP, reduce el nivel de degradación de cAMP o reduce el nivel de inhibición de cAMP.

Un ejemplo de PcAMP sería I:PDE, tal como I:PDEII.

Miméticos de cAMP

Para algunos aspectos de la presente invención el agente puede actuar como un mimético de cAMP.

Como se utiliza en la presente, el término "mimético de cAMP" significa un agente que puede actuar de modo similar (es decir tener un perfil y un efecto biológico similares) al cAMP en los genitales sexuales femeninos, y hacerlo mediante uno o más de: aumento de la eficacia de los restos similares a cAMP, aumento de los niveles de los restos similares a cAMP, aumento de la actividad de los restos similares a cAMP, reducción del nivel de degradación de los restos similares a cAMP, reducción del nivel de inhibición de los restos similares a cAMP.

De esta manera, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de FSAD, comprendiendo la

PATENTES ... MORENO
... AM
... 113
... MADRID
Teléf. 519 ...

composición farmacéutica un agente capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

De esta manera, en otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

De esta manera, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de actuar como un mimético de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente en una cantidad que potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un ejemplo de mimético de cAMP sería la forscolina. Hemos encontrado que la forscolina aumenta el flujo sanguíneo

[illegible] MORENO
[illegible] MADRID

vaginal y clitorídeo y puede actuar también como relajante vaginal.

En un aspecto preferido, el mimético de cAMP se administra oralmente.

ACTIVADOR DE cAMP

Como se utiliza en la presente, el término "activador de cAMP" significa una sustancia que controla o libera cAMP en los genitales sexuales femeninos. El control puede ser directo (por ejemplo sobre el mismo cAMP) o indirecto (por ejemplo por activación de cAMP). Para facilitar la referencia se hace referencia a estas sustancias como $A_{cAMP}$.

DIANA

El término "diana" como se utiliza en la presente con referencia a la presente invención significa cualquier sustancia que sea cAMP, un $A_{cAMP}$, un $I_{cAMP}$ o un $AM_{cAMP}$. Expresado de otra manera, la diana puede referirse como una diana $P_{cAMP}$.

La diana del agente de la presente invención puede ser una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos

[illegible] MORENO
[illegible]
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

que codifica la misma y/o una unidad de expresión responsable de la expresión de la misma y/o un modulador de la misma.

La diana puede ser incluso una combinación de dichas dianas.

AGENTE

El agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como una $P_{cAMP}$.

El agente puede ser una secuencia de aminoácidos o un derivado químico de ésta. La sustancia puede ser incluso un compuesto orgánico u otro compuesto químico. El agente puede incluso ser una secuencia de nucleótidos, que puede ser una secuencia con sentido o una secuencia sin sentido. El agente puede ser incluso un anticuerpo.

De esta manera, el término "agente" incluye, aunque no está limitado a él, un compuesto que puede obtenerse o producirse mediante cualquier fuente adecuada, natural o no.

El agente puede diseñarse u obtenerse a partir de una

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
Tel. [illegible]

1640

biblioteca de compuestos que puede comprender péptidos, así como otros componentes tales como moléculas orgánicas pequeñas, como compuestos líder.

Como ejemplo, el agente puede ser una sustancia natural, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos como células o tejidos de bacterias, hongos, o animales (particularmente mamíferos), una molécula orgánica o inorgánica, un agente sintético, un agente semisintético, un mimético estructural o funcional, un péptido, un mimético de péptido, un agente derivado, un péptido cortado a partir de una proteína entera, o un péptido obtenido sintéticamente (como, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos o por técnicas recombinantes o combinaciones de éstos), un agente recombinante, un anticuerpo, un agente natural o no natural, una proteína de fusión o equivalente de ésta y mutantes, derivados o combinaciones de éstos.

Como se utiliza en la presente, el término "agente" puede ser una entidad simple o puede ser una combinación de agentes.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, tal como cuando el agente es un

PATRICIA ... MORENO
... MADRID

I:NEP, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente un grupo amida (es decir N(H)-C(O)- o incluso -C(O)-N(H)-) y uno o más grupos hidrocarburo. En este caso, el término "grupo hidrocarburo" significa un grupo que comprende al menos C y H y puede comprender opcionalmente uno o más sustituyentes adecuados. Ejemplos de dichos sustituyentes pueden incluir halo, alcoxi, nitro, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes pueden formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarburo comprende más de un C, estos carbonos no tienen porque estar unidos necesariamente unos a otros. Por ejemplo, al menos dos de los carbonos pueden estar unidos a través de un elemento o grupo adecuado. De esta manera, el grupo hidrocarburo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente un grupo cíclico. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente un grupo cíclico unido a otro grupo hidrocarburo por medio de un enlace amida. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para

PATRICIA KOCH MORENO
INGLÉS ... AN
... MADRID
Tel...

algunas aplicaciones, como si el agente es un I:PDE, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente dos o más grupos hidrocarburo unidos. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente al menos dos grupos cíclicos, siendo uno de dichos grupos cíclicos una estructura de anillo cíclico condensado. Para algunas aplicaciones, al menos uno de los grupos cíclicos es preferiblemente un grupo heterocíclico. Para algunas aplicaciones, el grupo heterocíclico comprende preferiblemente al menos un N en el anillo. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, tal como cuando el agente es un I:NPY, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente dos o más grupos hidrocarburo unidos. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente al menos dos grupos cíclicos, siendo opcionalmente uno de dichos grupos cíclicos una estructura de anillo cíclico condensado. Para algunas aplicaciones, al menos uno de los grupos cíclicos es preferiblemente un grupo heterocíclico. Para algunas aplicaciones, el grupo heterocíclico comprende preferiblemente al menos un N en el anillo. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos

[illegible] MORENO
INGLÉS Y [illegible]
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

1643

de la presente.

El agente puede contener grupos halo. En este caso, "halo" significa fluoro, cloro, bromo o yodo.

El agente puede contener uno o más grupos alquilo, alcoxi, alquenilo, alquileno o alquenileno, que pueden ser de cadena lineal o ramificada.

El agente puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, como una sal de adición de ácidos o una sal básica o un solvato de éstas, incluyendo un hidrato de éstas. Para una revisión de las sales adecuadas véase Berge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19.

Las sales de adición de ácidos adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas y son ejemplos las sales clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, fosfato, fosfato ácido, acetato, maleato, fumarato, lactato, tartrato, citrato, gluconato, succinato, sacarato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, para-toluenosulfonato y pamoato.

Las sales básicas adecuadas se forman a partir de bases que

[illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

forman sales no tóxicas y son ejemplos las sales de sodio, potasio, aluminio, calcio, magnesio, zinc y dietanolamina.

Una sal farmacéuticamente aceptable de un agente de la presente invención puede prepararse fácilmente mezclando disoluciones del agente y del ácido o base deseados, según sea apropiado. La sal puede precipitar de la disolución y recogerse por filtración o bien puede recuperarse por evaporación del disolvente.

El agente de la presente invención puede existir en forma polimórfica.

El agente de la presente invención puede contener uno o más átomos de carbono asimétricos y existir por lo tanto en dos o más formas estereoisoméricas. Cuando un agente contiene un grupo alquenilo o alquenileno puede aparecer también isomería cis (E) y trans (Z). La presente invención incluye los estereroisómeros individuales del agente y, cuando es apropiado, las formas tautoméricas individuales de éste, junto con las mezclas de éstas.

La separación de los diastereoisómeros o de los isómeros cis y trans puede conseguirse por técnicas convencionales, por ejemplo mediante cristalización fraccionada,

MORENO
AN
113
ADRID
Telé.

cromatografía o HPLC de una mezcla estereoisomérica del agente o de una sal adecuada o de un derivado de éstos. Un enantiómero individual del agente puede prepararse también a partir del intermedio correspondiente ópticamente puro o por resolución, como por HPLC del correspondiente racemato utilizando un soporte quiral adecuado, o por cristalización fraccionada de las sales diastereoisoméricas formadas por reacción del correspondiente racemato con un ácido o base ópticamente activo, según sea apropiado.

La presente invención incluye también todas las variaciones isotópicas adecuadas del agente o de una sal farmacéuticamente aceptable de éste. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o de una sal farmacéuticamente aceptable de éste se define como uno en el que al menos un átomo está reemplazado por un átomo con el mismo número atómico pero con masa atómica diferente de la masa atómica encontrada habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse al agente y a las sales farmacéuticamente aceptables de éste, incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro como $^{2}H$, $^{3}H$, $^{13}C$, $^{14}C$, $^{15}N$, $^{17}O$, $^{18}O$, $^{31}P$, $^{32}P$, $^{35}S$, $^{18}F$ y $^{36}Cl$, respectivamente. Ciertas variaciones isotópicas del agente y de las sales farmacéuticamente aceptables de éste, por

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID

ejemplo aquellas en las que se incorpora un isótopo radiactivo como $^{3}$H o $^{14}$C, son útiles en estudios de distribución en tejidos de medicamentos y/o sustratos. Los isótopos tritio, es decir $^{3}$H y carbono 14, es decir $^{14}$C, son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos como deuterio, es decir $^{2}$H, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas debidas a una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo un aumento de la semivida in vivo o una reducción de los requerimientos de dosificación, y por lo tanto pueden preferirse en algunas circunstancias. Las variaciones isotópicas del agente de la presente invención y de las sales farmacéuticamente aceptables de éste de esta invención pueden prepararse generalmente mediante procedimientos convencionales utilizando las variaciones isotópicas apropiadas de los reactivos adecuados.

Se apreciará por los expertos en la técnica que el agente de la presente invención puede derivar de un profármaco. Los ejemplos de profármacos incluyen entidades que tienen ciertos grupos protegidos y que pueden no poseer actividad farmacológica como tales pero que pueden administrarse, en ciertos casos, (oral o parenteralmente, por ejemplo) y a continuación metabolizarse en el cuerpo para formar el agente de la presente invención que es farmacológicamente

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
[illegible] 113
Teléf. [illegible] MADRID

activo.

Se apreciará además que ciertos restos conocidos como "prorrestos", por ejemplo como los descritos en "Design of Prodrugs" de H. Bundgaard, Elsevier, 1985 (cuya descripción se incorpora a la presente como referencia), pueden situarse sobre funcionalidades adecuadas de los agentes. Dichos profármacos se incluyen también en el alcance de la invención.

El $P_{cAMP}$ puede realizar una o más de las siguientes funciones: aumentar directa o indirectamente la eficacia del cAMP, aumentar directa o indirectamente los niveles de cAMP, aumentar directa o indirectamente la actividad de cAMP, reducir directa o indirectamente el nivel de degradación de cAMP o reducir directa o indirectamente el nivel de inhibición de cAMP.

Preferiblemente, el agente aumenta directa o indirectamente los niveles de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

Más preferiblemente, el agente aumenta selectivamente y directa o indirectamente los niveles de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

MORENO
MADRID

Más preferiblemente, el agente aumenta selectivamente y directa o indirectamente los niveles de cAMP, siendo el citado cAMP, cAMP inducido por excitación sexual.

En un aspecto altamente preferido, el agente de la presente invención aumenta la cantidad relativa de cAMP inducido por excitación sexual.

Para algunas aplicaciones el agente trata selectivamente el FSAD.

En un aspecto, el agente puede inhibir o antagonizar una diana adecuada y, al hacerlo, potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales femeninos. En el texto se ha utilizado el término inhibidor para significar un inhibidor y/o un antagonista.

En otro aspecto, el agente puede activar o agonizar una diana adcuada y, al hacerlo, potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales femeninos. En el texto se han utilizado los términos activador e inhibidor de sobrerregulación para significar un activador y/o un sobrerregulador y/o un agonista.

De esta manera, el agente puede agonizar, antagonista,

PATRICIA [illegible] MORENO
ING[illegible]AN
[illegible]
[illegible]RID
Tel. [illegible]

1649

sobrerregular o inhibir una diana adecuada.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, o además, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

Preferiblemente, el agente puede agonizar selectivamente, antagonizar selectivamente, sobrerregular selectivamente o inhibir selectivamente una diana adecuada.

Preferiblemente, el agente puede agonizar selectivamente, antagonizar selectivamente, sobrerregular selectivamente o inhibir selectivamente una diana selectiva adecuada.

El agente de la presente invención puede ser capaz también de mostrar una o más propiedades funcionales beneficiosas adicionales. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede potenciar cAMP así como potenciar cGMP.

Para algunas aplicaciones (tal como para administración tópica), el agente puede mostrar también una acción inhibidora de ACE (enzima conversora de angiotensina). Se presenta un ensayo de ACE en la sección experimental de la presente. Para algunas aplicaciones (tal como con tipos

PATRICIA MORENO
RID

1650

particulares de paciente), dichos agentes (es decir aquellos que muestran acción inhibidora de ACE) pueden no ser adecuados para administración oral.

Para algunas aplicaciones el agente puede mostrar también una acción inhibidora de ECE (enzima conversora de endotelio). Los ensayos de ECE son bien conocidos en la técnica.

## COMBINACIONES FARMACEUTICAS

Puede utilizarse el agente en combinación con uno o más de otros agentes farmacéuticamente activos, como un $P_{cGMP}$ (como un inhibidor de fosfodiesterasa de tipo 5, por ejemplo sildenafilo, o un donante de óxido nítrico, o un precursor de óxido nítrico, por ejemplo L-arginina) y/o un compuesto farmacéutico de acción central (por ejemplo un receptor de dopamina o un agonista del receptor de melanocortina como apomorfina o melanotán II). Las explicaciones sobre el uso de apomorfina como compuesto farmacéutico pueden encontrarse en el documento US-A-5945117. En ese documento particular se suministra la apomorfina por vía sublingual. Además, o como alternativa, el agente puede utilizarse en combinación con uno o más de: inhibidor de PDE5 (por ejemplo sildenafilo, vardenafilo (Bayer BA 38-9456) e IC351

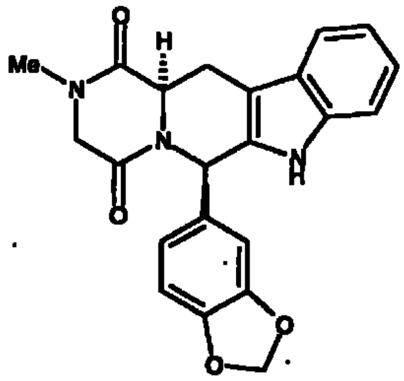
PATRICIA NASH MORENO
...AN
...RID
Telé...

(Cialis, Icos Lilly)), uno o más de un donante de óxido nítrico (por ejemplo NMI-921), uno o más de un agonista del receptor de dopamina (por ejemplo apomorfina, Uprima, Ixsene), uno o más de un agonista del receptor de melanocortina (por ejemplo Melanotón II o PT14), uno o más de un abridor de canal de potasio (por ejemplo un abridor de canal $K_{ATP}$ (por ejemplo minoxidil, nicorandil)) y/o un abridor de canal de potasio activado por calcio (por ejemplo BMS-204352), uno o más de un antagonista del adrenoceptor $\alpha1$ (por ejemplo fentolamina, Vasofem, Vasomax), uno o más de un agonista del receptor de VIP o de un análogo de VIP (por ejemplo Ro-125-1553) o un fragmento de VIP, uno o más de un antagonista del adrenoceptor $\alpha1$ en combinación con VIP (por ejemplo Invicorp, Aviptadil), uno o más de un antagonista del adrenoceptor $\alpha2$ (por ejemplo yohimbina), uno o más de un estrógeno, estrógeno y medroxiprogesterona o acetato de medroxiprogesterona (MPA) o un estrógeno y un agente de terapia de sustitución de la hormona metiltestosterona (por ejemplo HRT, especialmente Premarin, Cenestin, Oestrofeminal, Equin, Estrace, Estrofem, Elleste Solo, Estring, Eastradem, Eastraderm TTS, Eastraderm Matrix, Dermestil, Premphase, Prempro, Prempak, Premique, Estratest, Estratest HS, Tibolone), uno o más de un agente de sustitución de la testosterona (incluido DHEA

[illegible] RID

(deshidroandrostendiona), testosterona (Tostrelle) o un implante de testosterona (Organon)), uno o más de un agente de testosterona/estradiol, uno o más de un agonista de estrógeno, por ejemplo Lasofoxifene, uno o más de un agonista o antagonista del receptor de serotonina (por ejemplo agonistas y antagonistas del receptor de 5HT1A, 5HT2C, 5HT2A y 5HT3, como se describen en el documento WO 2000/28993), uno o más de un agonista del receptor de prostanoide (por ejemplo Muse, alprostadil, misoprostol), uno o más de un agonista del receptor purinérgico (especialmente P2Y2 y P2Y4), uno o más agentes antidepresivos (por ejemplo bupropión (Wellbutrin), mirtazapina, nefazodona).

La estructura de IC351 es:



IC351 (Icos Lilly)

Si se administra una combinación de agentes activos, éstos

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] :RID
Telé: [illegible]

1653

pueden administrarse simultánea, separada o secuencialmente.

COMBINACION DE VIP

Según la presente invención, el agente no es VIP (o preferiblemente no es un análogo de éste o un fragmento de éste). Sin embargo, para algunas realizaciones, el agente de la presente invención puede coadministrarse con VIP o con un análogo de éste o con un fragmento de éste.

En un aspecto altamente preferido, no se administra VIP o un análogo de éste o un fragmento de éste. Esto es debido a que ha habido informes de que las infusiones de VIP conducen a efectos cardiovasculares adversos significativos, como aumentos del ritmo cardiaco y reducción de la presión sanguínea arterial diastólica (Ottesen 1983, 1987, 1995).

Además, aunque Ottesen y colaboradores han demostrado que VIP induce aumentos en el flujo sanguíneo vaginal y en la lubricación en voluntarias sanas, el mecanismo por el cual VIP ejerce sus efectos no está claro. En la bibliografía, existe una serie de ejemplos de señalización de VIP mediante distintos sistemas de segundo mensajero, por

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible] [illegible]AN
C. [illegible] [illegible]
Telef. [illegible] MADRID

ejemplo cGMP/guanilato ciclasa (Ashur-Fabian, 1999), monóxido de carbono (CO)/hemo oxigenasa (Fan et al., 1998) y cAMP/adenilato ciclasa (Foda, 1995, Schoeffter, 1985, Gu, 1992). Esto se ejemplifica en un informe reciente que describe cómo pueden explicarse los efectos vasorrelajantes de VIP en la arteria uterina por la liberación de óxido nítrico (Jovanovic, 1998). De nuevo, existen también evidencias de modulación de VIP por óxido nítrico (NO)/cGMP en la funnción urogenital masculina (Kim, 1994).

Además, se ha informado en la bibliografía de que VIP no tiene efectos sobre los niveles de cAMP en cultivos de células de músculo liso vaginal (véase Traish, A., Moreland, R.B., Huang, Y., et al. (1999). Development of human and rabbit vaginal smooth muscle cell cultures: Effects of vasoactive agents on intracellular levels of cyclic nucleotides. *Mol. Cell. Biol. Res. Comm.*, 2, 131-137).

Además, en estudios de seguimiento, Ottesen y colaboradores (véase Palle, Bredkjaer, Ottesen y Fahrenkrug, 1990 Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, vol 17, 61-68) informan de que el efecto de VIP sobre el flujo sanguíneo vaginal, independientemente de la vía de administración, es parte de un efecto vasodilatador

PATRICIA MORENO
ING
MADRID
Tel.

sistémico más que de una respuesta local. Además, informan de una serie de efectos secundarios vasculares asociados a VIP, a saber, sofocos, hipotensión y taquicardia.

Valores de $K_i$

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención tiene preferiblemente un valor de $K_i$ inferior a aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

Valores de $K_b$

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención tiene preferiblemente un valor de $K_b$ menor de aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible] AN
c. [illegible], 113
Teléf. [illegible] MADRID

aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

Valores de $K_a$

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención tiene preferiblemente un valor de $K_a$ inferior a aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

## FARMACOCINETICA

Para algunas realizaciones de la presente invención, los agentes de la presente invención (por ejemplo inhibidores I:NEP) tienen preferiblemente un log D de -2 a +4, más preferiblemente de -1 a +2. El log D puede determinarse por procedimientos estándar conocidos en la técnica como los

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS [illegible]
[illegible] MADRID

descritos en J. Pharm. Pharmacol. 1990, 42:144.

Además, o como alternativa, para algunas realizaciones los agentes de la presente invención (por ejemplo I:NEP) tienen preferiblemente un flujo de células caco-2 superior a 2 x $10^{-6}cm^{-1}$, más preferiblemente superior a 5 x $10^{-6}cm^{-1}$. El valor de flujo de células caco puede determinarse por procedimientos estándar conocidos en la técnica como los descritos en J. Pharm. Sci. 79, 7, p595-600, (1990), y Pharm. Res., vol.14, n°6 (1997).

SELECTIVIDAD

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención tiene preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 100 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 150 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 200 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 250 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 300 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID

aproximadamente 350 veces hacia la diana deseada.

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención tiene preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 400 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 500 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 600 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 700 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 800 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 900 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 1000 veces hacia la diana deseada.

## PROCEDIMIENTOS QUIMICOS DE SINTESIS

Típicamente el agente de la presente invención se preparará mediante técnicas químicas de síntesis.

El agente o diana de la presente invención o variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos de éste pueden

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

producirse utilizando procedimientos químicos para sintetizar el agente por entero o en parte. Por ejemplo, pueden sintetizarse los péptidos por técnicas de fase sólida, separarse de la resina y purificarse por cromatografía líquida de alta resolución (por ejemplo Creighton (1983) Proteins Structure and Molecular Principles, WH Freeman and Co., Nueva York, NY). La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse por análisis o secuenciación de aminoácidos (por ejemplo el procedimiento de degradación de Edman, Creighton, *supra*).

La síntesis directa del agente o variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos de éste puede llevarse a cabo utilizando diversas técnicas en fase sólida (Roberge J.Y., et al., (1995) Science 269: 202-204) y puede conseguirse la síntesis automatizada, por ejemplo utilizando el Sintetizador de péptidos ABI 43 1 A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Además, la secuencia de aminoácidos que comprende el agente o cualquier parte de éste, puede alterarse durante la síntesis directa y/o combinarse utilizando procedimientos químicos con una secuencia de otras subunidades, o cualquier parte de ésta, para producir un agente o diana variante como, por ejemplo, una variante

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

PDE, NEP o NPY.

En una realización alternativa de la invención, la secuencia de codificación de la diana, del agente o de variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos de éste puede sintetizarse, en todo o en parte, utilizando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers, M.H. et al., (1980) Nuc Acids Symp Ser 215-23, Horn T. et al, (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

## MIMETICO

Como se utiliza en la presente, el término "mimético" se refiere a cualquier compuesto químico que incluye, aunque no está limitado a ellos, un péptido, polipéptido, anticuerpo u otro compuesto químico orgánico que tiene la misma actividad o efecto cualitativo que el agente de referencia respecto de una diana.

## DERIVADO QUIMICO

El término "derivado" o "derivatizado", como se utiliza en la presente, incluye la modificación química de un agente. Un ejemplo de dichas modificaciones químicas sería el reemplazamiento de hidrógeno por un grupo halo, un grupo

PATRICIA KOCH MORENO
MAN
RID

1661

alquilo, un grupo acilo o un grupo amino.

MODIFICACION QUIMICA

En una realización de la presente invención el agente puede ser un agente modificado químicamente.

La modificación química de un agente de la presente invención puede estimular o reducir la interacción de puente de hidrógeno, la interacción de cargas, la interacción hidrofóbica, la interaccion de Van der Waals o la interacción de dipolos entre el agente y la diana.

En un aspecto, el agente identificado puede actuar como un modelo (por ejemplo un molde) para el desarrollo de otros compuestos.

PROCEDIMIENTOS RECOMBINANTES

Típicamente la diana de la presente invención para uso en el ensayo de la presente invención puede prepararse por técnicas de DNA recombinante.

PATRICIA KOCH MORENO
[illegible] MAN
MADRID

POTENCIACION DE cGMP

Como se utiliza en la presente con referencia al cGMP, el término "potenciar" incluye uno o más de: aumento de la eficacia del cGMP, aumento de los niveles de cGMP, aumento de la actividad de cGMP, reducción del nivel de degradación de cGMP, reducción del nivel de inhibición de cGMP.

El efecto potenciador puede ser un efecto directo. Como alternativa, podría ser un efecto secundario y/o un efecto cadena abajo.

En este caso, el agente que potencia el cGMP actúa preferiblemente como un $I_{cGMP}$ y/o un $AM_{cGMP}$, teniendo el modulador de cGMP un efecto adverso sobre cGMP, de modo que el agente reduce y/o elimina y/o enmascara y/o desvía el efecto perjudicial del $I_{cGMP}$ y/o del $AM_{cGMP}$ hacia cGMP.

Por ello, la presente invención comprende una combinación de uno o más $I{:}I_{cAMP}$ y uno o más $I{:}I_{cGMP}$.

En un aspecto, el $I{:}I_{cGMP}$ es un $I{:}PDE_{cGMP}$.

MORENO
AN
113
MADRID

## $I_{cAMP}$ Y/O $AM_{cAMP}$

Se ha mostrado que el cAMP media el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), y que estimulando la señalización de cAMP se puede estimular el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal y clitorídeo) en un modelo animal. Así, un agente que sobrerregula/estimula la vasorrelajación mediada por cAMP será eficaz en el tratamiento de FSAD. Para facilitar la referencia, nos referimos a estas sustancias como $I_{cAMP}$ y/o $AM_{cAMP}$. En este caso, los $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ tienen un efecto adverso sobre los niveles de actividad de cAMP.

Por ello, el agente puede ser uno o más de: un I:$I_{cAMP}$ y/o un I:$AM_{cAMP}$.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

Los ejemplos de $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ incluyen uno o más de PDE, NPY y NEP, o cualquier componente asociado a éstos. El componente asociado puede ser, por ejemplo, un receptor y/o un cofactor.

PATRICIA HOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
MADRID
Teléf.

1664

De esta manera, el agente puede ser preferiblemente uno o más de: un I:PDE$_{cAMP}$, un I:NPY, (a veces escrito como NPYi), un I:NPY Y$_n$ (a veces escrito como NPY Y$_n$i) e I:NEP.

De manera similar, el agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

## I:I$_{cAMP}$ Y/O I:AM$_{cAMP}$

Según la presente invención, se ha encontrado que es posible tratar y/o prevenir FSAD utilizando un agente que reduce y/o elimina y/o enmascara y/o desvía y/o previene el efecto perjudicial de I$_{cAMP}$ y AM$_{cAMP}$ hacia cAMP. El agente puede incluso restablecer los niveles de cAMP que habían reducido el I$_{cAMP}$ y el AM$_{cAMP}$. En este caso, el I:I$_{cAMP}$ e I:AM$_{cAMP}$ previenen o reducen el efecto adverso sobre los niveles de actividad del cAMP.

De esta manera, en un aspecto preferido, el agente es un I:I$_{cAMP}$ y/o un I:AM$_{cAMP}$, teniendo el AM$_{cAMP}$ un efecto perjudicial sobre AM$_{cAMP}$.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] S Y [illegible] AN
C. [illegible] A [illegible]RID
Telf. [illegible]

1665

En un aspecto preferido, el agente puede ser uno o más de:

I:$PDE_{cAMP}$

I:$PDEn_{cAMP}$ (donde n indica una clase o subclase apropiada)

I:NPY

I:NPY $Y_n$ (donde n indica una clase o subclase apropiada)

**$A_{cAMP}$**

Según la presente invención, se ha encontrado que una de las causas importantes de FSAD es debida a los bajos niveles o a la baja actividad de cAMP en los genitales femeninos.

Por ello, el agente puede ser un U:$A_{cAMP}$.

Ejemplos de $A_{cAMP}$ incluyen VIP y AC, o cualquier componente asociado a ellos. El componente asociado puede ser, por ejemplo, un receptor y/o un cofactor.

De esta manera, el agente puede ser preferiblemente uno o más de: A:AC, A:VIPr, A:$VIP_n$, I:I:VIPr o I:I:$VIP_n$.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa,

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID
Telf.

el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

$U:A_{cAMP}$

En otro aspecto, la diana es preferiblemente un componente que aumenta el nivel de cAMP. Por ello, el agente puede ser un U:AC.

Como ejemplo, la diana puede ser el cAMP mismo o AC o VIP (o combinaciones de éstos).

Por ello, como ejemplo, el agente puede ser cualquiera de: un $U:A_{cAMP}$, un A:AC, un A:VIPr, un $A:VIP_n$, un I:I:VIPr o un $I:I:VIP_n$.

COMBINACION DE $I:I_{cAMP}$ Y/O $I:M_{cAMP}$ Y/O $U:A_{cAMP}$

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede ser una combinación de potenciadores de cAMP. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede ser dos o más de:

$I:PDE_{cAMP}$
$I:PDEn_{cAMP}$
I:NPY

PATRICIA RIGO MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. Cartagena, 113
Teléf. 510[illegible] - MADRID

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

## COMBINACION DE MIMETICO DE cAMP è I:$I_{cAMP}$ Y/O I:$M_{cAMP}$ Y/O U:$A_{cAMP}$

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede ser una combinación de un mimético de cAMP y uno o más potenciadores de cAMP. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede ser un mimético de cAMP y uno o más de:

I:$PDE_{cAMP}$

I:$PDEn_{cAMP}$

I:NPY

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

MORENO
MADRID

A:VIPr

A:VIP$_n$

I:I:VIPr

I:I:VIP$_n$

INHIBIDOR

El término "inhibidor", como se utiliza en la presente con respecto al agente de la presente invención, significa un agente que puede reducir y/o eliminar y/o enmascarar y/o evitar la acción perjudicial de un I$_{cAMP}$ y/o un M$_{cAMP}$ hacia cAMP. El inhibidor puede actuar como un antagonista.

ACTIVADOR

El término "activador", como se utiliza en la presente con respecto del agente de la presente invención, significa un agente que puede aumentar y/o producir y/o desenmascarar y/o elevar y/o asegurar la acción de cAMP y/o un A$_{cAMP}$. El activador puede actuar como un agonista.

OTROS COMPONENTES ACTIVOS

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede estar en combinación con uno o más de otros compuestos

[illegible] MORENO
[illegible]
[illegible] MADRID

activos, tal como uno o más agentes capaces de potenciar cGMP.

SECUENCIA DE AMINOACIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "proteína".

La secuencia de aminoácidos puede prepararse aislada de una fuente adecuada, o puede prepararse sintéticamente o puede prepararse mediante el uso de técnicas de DNA recombinante.

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de aminoácidos que es capaz de actuar como una diana en un ensayo para la identificación de uno o más agentes y/o derivados de éstos capaces de afectar a la secuencia de aminoácidos a fin de potenciar el cAMP para tratar FSAD.

SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de nucleótidos" es sinónimo del término "polinucleótido".

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

1670

La secuencia de nucleótidos puede ser DNA o RNA de origen genómico, o sintético o recombinante. La secuencia de nucleótidos puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, representando la cadena con sentido o sin sentido o combinaciones de éstas.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente DNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos está preparada preferiblemente mediante el uso de técnicas de DNA recombinante (por ejemplo DNA recombinante).

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente cDNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos puede ser preferiblemente la misma que la forma de origen natural para este aspecto.

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una sustancia capaz de actuar como una diana en un ensayo (como un ensayo de dos híbridos de levadura) para la identificación de uno o más agentes y/o derivados de éstos capaces de afectar a la

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 13
[illegible] RID
[illegible]

sustancia a fin de potenciar el cAMP para tratar FSAD.

Un experto en la técnica comprenderá que numerosas secuencias diferentes de nucleótidos pueden codificar las dianas de la presente invención como resultado de la degeneración del código genético. Además, se comprenderá que los expertos puedan preparar, utlizando técnicas de rutina, sustituciones de nucleótidos que no afecten sustancialmente a la actividad codificada por la secuencia de nucleótidos de la presente invención para reflejar el uso del codon de cualquier organismo huésped en el que se exprese la diana de la presente invención. De esta manera, los términos "variante", "homólogo" o "derivado", en relación con la secuencia de nucleótidos descrita en los listados de secuencias adjuntos, incluyen cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazamiento de, deleción de o adición de uno (o más) ácidos nucleicos de la secuencia o a la secuencia siempre que la secuencia de nucleótidos resultante codifique una diana funcional según la presente invención (o incluso un agente según la presente invención si el citado agente comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos).

Como se ha indicado anteriormente con respecto a la

[illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] RID

homología de secuencia, existe preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90% de homología con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente. Más preferiblemente, existe al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 98% de homología. Las comparaciones de homología de nucleótidos pueden realizarse como se ha descrito anteriormente. Un programa de comparación de secuencia preferido es el programa GCG Wisconsin Bestfit descrito anteriormente. La matriz de puntuación por defecto tiene un valor de correspondencia de 10 para cada nucleótido idéntico y -9 para cada desparejamiento. La penalización por creación de un hueco por defecto es -50 y la penalización por extensión de un hueco por defecto es -3 para cada nucleótido.

La presente invención comprende también secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias presentadas en la presente, o con cualquier variante, fragmento o derivado de éstas, o con el complemento de cualquiera de las anteriores. Las secuencias de nucleótidos son preferiblemente de al menos 15 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de al menos 20, 30, 40 ó 50 nucleótidos de longitud. Estas secuencias podrían utilizarse como sondas, tal como en un estuche de

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cr[illegible] 13
Teléf. 51[illegible] MADRID

diagnóstico.

VARIANTES/HOMOLOGOS/DERIVADOS

Además de las secuencias de aminoácidos y de las secuencias de nucleótidos específicas mencionadas en la presente, la presente invención comprende también el uso de variantes, homólogos y derivados de éstas. En este caso, el término "homología" puede igualarse a "identidad".

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos un 75, 85 ó 90% idéntica, preferiblemente al menos un 95 ó 98% idéntica. En particular, la homología debería considerarse con respecto a aquellas regiones de la secuencia conocidas por ser esenciales para una actividad. Aunque la homología puede considerarse también en términos de similitud (es decir residuos de aminoácidos con propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología pueden realizarse manualmente, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencia disponibles fácilmente. Estos

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID

programas de ordenador comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir una secuencia se alinea con la tra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina un alineamiento "sin huecos". Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se realizan sólo sobre un número relativamente pequeño de residuos.

Aunque este es un procedimiento muy simple y consistente, no consigue tener en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o una deleción producirá que los siguientes residuos de aminoácidos estén fuera de la alineación, dando como resultado potencial una gran reducción del % de homología cuando se realiza un alineamiento global. Consiguientemente, la mayoría de los procedimientos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta las posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente la puntuación general de homología. Esto se consigue insertando "huecos" en el alineamiento de secuencia para

PATRICIA ROCH MORENO
...NGLES Y ALEMAN
c. ..., 113
... MADRID
Teléf. ...

intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan "penalizaciones de huecos" a cada hueco que aparece en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una secuencia de aminoácidos con tan pocos huecos como sea posible, lo que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas, conseguirá una mayor puntuación que una con muchos huecos. Los "costes de huecos afines" que se utilizan típicamente, cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco, y una penalización menor por cada residuo posterior al hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más habitualmente utilizado. Las penalizaciones por huecos mayores darán lugar por supuesto a alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se utiliza dicho software para comparaciones de secuencia. Por ejemplo, al utilizar el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase a continuación) la penalización por hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

El cálculo del máximo % de homología requiere por lo tanto

PATRICIA NESS MORENO
INGLES Y ALEMAN
MADRID

primeramente la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa de ordenador adecuado para llevar a vabo dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, EE.UU., Devereux, et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencias incluyen, aunque no están limitados a ellos, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999, ibidem, capítulo 18), FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación GENEWORKS. Ambos BLAST y FASTA están disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel et al., 1999, ibidem, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit. Una nueva herramienta llamada BLAST 2 Sequences está también disponible para comparar secuencias de proteínas y nucleótidos (véanse FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50, FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el propio proceso de alineamiento típicamente no está basado en la comparación de pares todo-o-nada. En lugar de eso, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similitud graduada que asigna puntuaciones

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

a cada comparación emparejada basada en la similitud química o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz utilizada habitualmente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el conjunto BLAST de programas. El programa GCG Wisconsin utiliza generalmente los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos habituales si se suministra (véase el manual del usuario para más detalles). Se prefiere utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz por defecto, como BLOSUM62.

Una vez el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software realiza esto típicamente como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

Las secuencias pueden tener también deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una sustancia de funcionalidad equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden realizarse sobre la base de similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia, y/o naturaleza anfipática de los residuos siempre y cuando se conserve la actividad de unión secundaria de la

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos negativamente cargados incluyen ácido aspártico y ácido glutámico, los aminoácidos positivamente cargados incluyen lisina y arginina, y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados con valores de hidrofilia similar incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Las sustituciones conservativas pueden realizarse, por ejemplo, según la tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna, y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna, pueden sustituirse unos a otros.

| | | |
|---|---|---|
| ALIFATICO | No polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar sin carga | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar cargado | D E |
| | | K R |
| AROMATICO | | H F W Y |

La presente invención comprende también que pueda ocurrir la sustitución homóloga (sustitución y reemplazamiento se

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. [illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

utilizan ambos en la presente para significar el intercambio de un residuo de aminoácido existente por un residuo alternativo), es decir la sustitución de similar por similar, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También puede darse la sustitución no homóloga, es decir, de una clase de residuos por otra, o implicando como alternativa la inclusión de aminoácidos no naturales como ornitina (de aquí en adelante denominada Z), ornitina de ácido diaminobutírico (de aquí en adelante denominada B), ornitina norleucina (de aquí en adelante denominada O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazamientos pueden realizarse también con aminoácidos no naturales incluyendo: aminoácidos alfa* y alfa disustituidos*, N-alquilaminoácidos*, ácido láctico*, derivados haluro de aminoácidos naturales como trifluorotirosina*, p-Cl-fenilalanina*, p-Br-fenilalanina*, p-I-fenilalanina*, L-alilglicina*, β-alanina*, ácido L-α-aminobutírico*, ácido L-γ-aminobutírico*, ácido L-α-aminoisobutírico*, ácido L-ε-aminocaproico#, ácido 7-aminoheptanoico*, L-metioninasulfona#*, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxiprolina#, L-tioprolina*, derivados metilo de fenilalanina (Phe) como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr

PATRICIA KOCH MORENO
[illegible] LEMAN
[illegible], 113
MADRID
Tel. [illegible]

(metilo)*, L-Phe (4-isopropilo)*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico)*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-bencilo)*. La notación * se ha utilizado con los fines de la discusión anterior (relativa a la sustitución homóloga o no homóloga), para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado, mientras que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado, #* indica características anfipáticas.

Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden estar insertados entre dos residuos de aminoácidos cualesquiera de la secuencia, incluyendo grupos alquilo como grupos metilo, etilo o propilo además de espaciadores de aminoácidos como residuos de glicina o $\beta$-alanina. Otra forma de variación, que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoide, será bien comprendida por los expertos en la técnica. Para evitar dudas "la forma peptoide" se utiliza para referirse a residuos de aminoácidos variantes en los que el grupo sustituyente del carbono $\alpha$ está sobre el átomo de nitrógeno del residuo más que sobre al carbono $\alpha$. Los procedimientos para preparar péptidos en forma peptoide son conocidos en la técnica, por ejemplo Simon, R.J., et al., PNAS (1992) 89(29), 9367-9371 y Hornwell D.C., Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

PATRICIA [illegible] MARRERO
[illegible]
Telf. [illegible] MADRID

## HIBRIDACION

La presente invención comprende también el uso de secuencias que pueden hibridarse con las secuencias diana presentadas en la presente, como si el agente fuese una secuencia sin sentido.

El término "hibridación", como se utiliza en la presente, incluye "el procedimiento mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria mediante apareamiento de bases", así como el procedimiento de amplificación como el que se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena con polimerasa (PCR).

Las secuencias de nucleótidos de la invención capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente, o con su complemento, serán al menos un 75%, preferiblemente al menos un 85 ó 90% y más preferiblemente al menos un 95% ó 98% homólogas a las secuencias de nucleótidos complementarias correspondientes presentadas en la presente, en una región de al menos 20, preferiblemente al menos 25 ó 30, por ejemplo al menos 40, 60 ó 100 o más nucleótidos contiguos. Las secuencias de nucleótidos preferidas de la invención comprenderán regiones homólogas a la secuencia de nucleótidos descrita

[illegible]
[illegible] 113
[illegible] MADRID

en la SEC N° ID 2 del listado de secuencias de la presente invención, preferiblemente al menos un 80 ó 90%, y más preferiblemente al menos un 95% homólogas a la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC N° ID 2 del listado secuencias de la presente invención.

El término "selectivamente hibridable" significa que la secuencia de nucleótidos, cuando se utiliza como sonda, se utiliza en condiciones en las que se encuentra que la secuencia de nucleótidos diana se hibrida con la sonda a un nivel significativamente por encima del fondo. La hibridación de fondo puede aparecer debido a otras secuencias de nucleótidos presentes, por ejemplo en la biblioteca de cDNA o de DNA genómico que se rastrea. En este caso, el fondo implica un nivel de señal generada por la interacción entre la sonda y un miembro de la biblioteca de DNA no específico que tiene menos de 10 veces, preferiblemente menos de 100 veces, la intensidad de la interacción específica observada en el DNA diana. La intensidad de la interacción puede medirse, por ejemplo, por marcado radiactivo de la sonda, por ejemplo con $^{32}$P.

Las condiciones de hibridación están basadas en la temperatura de fusión (Tm) del complejo de unión del ácido nucleico, como explican Berger y Kimmel (1987, Guide to

PATRICIA MORENO

Molecular Cloning Techniques, Methodos in Enzimology, Vol 152, Academic Press, San Diego, CA), y confieren un "rigor" definido como se explica a continuación.

El rigor máximo aparece típicamente a aproximadamente Tm-5°C (5°C por debajo de la Tm de la sonda), el rigor elevado a aproximadamente 5°C a 10°C por debajo de la Tm, el rigor intermedio a aproximadamente 10°C a 20°C por debajo de la Tm, y el rigor bajo a aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de la Tm. Como comprenderán los expertos en la técnica, una hibridación de rigor máximo puede utilizarse para identificar o detectar secuencias de nucleótidos idénticas mientras que una hibridación de rigor intermedio (o bajo) puede utilizarse para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos similares o relacionadas.

En un aspecto preferido, la presente invención cubre secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con la secuencia de nucleótidos de la presente invención en condiciones rigurosas (por ejemplo a 65°C y 0,1xSSC (1xSSC = NaCl 0,15 M, Na$_3$citrato 0,015 M, pH = 7,0). Cuando la secuencia de nucleótidos de la invención es de doble cadena, ambas cadenas del dúplex, individualmente o en combinación, están comprendidas por la presente invención. Cuando la secuencia de nucleótidos es de una cadena, se

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

comprende que la secuencia complementaria de esa secuencia de nucleótdos está también incluida en el alcance de la presente invención.

Las secuencias de nucleótidos que no son un 100% homólogas a las secuencias de la presente invención pero que entran dentro del alcance de la invención, pueden obtenerse mediante una serie de formas. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente pueden obtenerse por ejemplo por sondeo de bibliotecas de DNA preparadas a partir de una serie de fuentes. Además, pueden obtenerse otros homólogos víricos/bacterianos o celulares, particularmente homólogos celulares encontrados en células de mamíferos, (por ejemplo células de rata, ratón, bovinas y de primate) y dichos homólogos y fragmentos de éstos serán en general capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente. Dichas secuencias pueden obtenerse sondeando bibliotecas de cDNA preparadas a partir de, o bibliotecas de DNA genómico a partir de otras especies animales y sondeando dichas bibliotecas con sondas que comprenden toda o parte de la secuencia de nucleótidos descrita en la presente en condiciones de medio a alto rigor. Se aplican consideraciones similares para obtener especies homólogas y variantes alélicas de las secuencias de aminoácidos y/o

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y [illegible] AN
[illegible] RID
Teléf. [illegible]

de nucleótidos de la presente invención.

Las variantes y homólogos de cepas/especies pueden obtenerse también utilizando PCR degenerada que utilizará cebadores diseñados para dirigirse a secuencias en las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, por alineamiento de las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencias pueden realizarse utilizando software informático conocido en la técnica. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp es ampliamente utilizado. Los cebadores utilizados en PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones de menor rigor que las utilizadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia simple frente a secuencias conocidas.

Como alternativa, dichas secuencias de nucleótidos pueden obtenerse por mutagénesis dirigida específica de sitio de secuencias caracterizadas, como la secuencia de nucleótidos descrita en SEC N°. ID 2 del listado de secuencias de la presente invención. Esto puede ser útil cuando se requieren por ejemplo cambios silenciosos de codón en las secuencias

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

1086

para optimizar las preferencias de codón para una célula huésped particular en la que se expresan las secuencias de nucleótidos. Pueden desearse otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o para alterar la actividad de la proteína codificada por las secuencias de nucleótidos.

Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden utilizarse para producir un cebador, por ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo marcada con un marcador revelable por medios convencionales utilizando marcaje radiactivo o no radiactivo, o las secuencias de nucleótidos pueden clonarse en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos serán al menos de 15, preferiblemente al menos de 20, por ejemplo al menos de 25, 30 ó 40 nucleótidos de longitud, y están también comprendidos en el término secuencia de nucleótidos de la invención como se utiliza en la presente.

Las secuencias de nucleótidos como polinucleótidos de DNA y sondas según la invención, pueden producirse recombinantemente, sintéticamente, o mediante cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También pueden clonarse por técnicas estándar.

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ... IAN
...RID
Tel...

1687

En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, implicando una fabricación por etapas de la secuencia de nucleótidos deseada, un nucleótido cada vez. Las técnicas para conseguir ésto utilizando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

Las secuencias de nucleótidos más largas generalmente se producirán utilizando medios recombinantes, por ejemplo utilizando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará preparar un par de cebadores (por ejemplo de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) adyacentes a la región de la secuencia diana que se desea clonar, poner los cebadores en contacto con mRNA o cDNA obtenido a partir de una célula animal o humana, realizar una reacción en cadena con polimerasa (PCR) en condiciones que llevan a la amplificación de la región deseada, aislan el fragmento amplificado (por ejemplo por purificación de la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperar el DNA amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de modo que el DNA amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

Debido a la degeneración inherente al código genético, pueden utilizarse otras secuencias de DNA que codifican

PATRICIA KIRK MORENO
INGLES Y [illegible]
c. [illegible] 13
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos, o una funcionalmente equivalente para clonar y expresar las secuencias diana. Como comprenderán los expertos en la técnica, para ciertos sistemas de expresión, puede ser ventajoso producir las secuencias diana con codones de origen no natural. Los codones preferidos para un huésped procariota o eucariota particular (Murray et al, (1989) Nuc Acids Res 17:477-508) pueden seleccionarse, por ejemplo, para aumentar la tasa de expresión de la diana o para producir transcriptos de RNA recombinante con propiedades deseables, como una semivida más larga que los transcriptos producidos a partir de secuencias de origen natural.

## VECTORES DE EXPRESION

La secuencia de nucleótidos para uso como diana o para expresar la diana puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede utilizarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos en y/o a partir de una célula huésped compatible. La expresión puede controlarse utilizando secuencias de control que incluyen promotores/estimuladores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden utilizarse promotores procarióticos y promotores funcionales en células eucarióticas. Pueden utilizarse promotores específicos de tejido o específicos

PATRICIA ... MORENO
... ADRID

1689

de estímulo. También pueden utilizarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes descritos anteriormente.

La proteína producida por una célula huésped recombinante mediante expresión de la secuencia de nucleótidos, puede segregarse o puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector utilizados. Las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de la sustancia codificada por las secuencias a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular.

## PROTEINAS DE FUSION

La secuencia de aminoácidos diana puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo como ayuda en la extracción y purificación. Ejemplos de compañeros de proteína de fusión incluyen glutation-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a DNA y/o activación transcripcional) y β-galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de corte proteolítico entre la secuencia del compañero de la proteína de fusión y la secuencia de proteína de interés para permitir la eliminación de las secuencias de la proteína de fusión. Preferiblemente la

PATRICIA ... MORENO
ING. ... MAN
C ... 113
Teléf. ... MADRID

proteína de fusión no impedirá la actividad de la diana.

La proteína de fusión puede comprender un antígeno o un determinante antigénico condensado a la sustancia de la presente invención. En esta realización, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de origen no natural que comprende una sustancia que puede actuar como coadyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmune. El antígeno o el determinante antigénico puede estar unido al extremo amino o carboxi de la sustancia.

En otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos puede estar ligada a una secuencia heteróloga que codifica una proteína de fusión. Por ejemplo, para rastrear bibliotecas de péptidos en busca de agentes capaces de influir en la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia quimérica que exprese un epitopo heterólogo que es reconocido por un anticuerpo disponible comercialmente.

## ANTICUERPOS

En una realización de la presente invención, el agente de la presente invención puede ser un anticuerpo. Además, o

[illegible] MORENO
[illegible] 113
MADRID
Telef. [illegible]

como alternativa, la diana de la presente invención puede ser un anticuerpo.

Los anticuerpos pueden producirse por técnicas estándar, tal como por inmunización con la sustancia de la invención o utilizando una biblioteca de muestra de fagos.

Para los fines de esta invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique otra cosa, incluye, aunque no está limitado a ellos, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos producidos por biblioteca de expresión Fab, así como miméticos de éstos. Dichos fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos enteros que conserven su actividad de unión para una sustancia diana, los fragmentos Fv, F(ab') y $F(ab')_2$, así como los anticuerpos de cadena simple (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Además, los anticuerpos y fragmentos de éstos pueden ser anticuerpos humanizados. Los anticuerpos neutralizantes, es decir, aquellos que inhiben la actividad biológica de los polipéptidos de la sustancia, son especialmente preferidos para diagnóstico y terapia.

Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un

PATRICIA KOCH MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telé [illegible]

mamífero seleccionado (por ejemplo ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un polipéptido inmunogénico que lleva un(os) epitopo(s) obtenible a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención. Dependiendo de la especie huésped, pueden utilizarse diversos coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos coadyuvantes incluyen, aunque no están limitados a ellos, geles minerales de Freund como hidróxido de aluminio y sustancias activas en superficie como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa de bocallave y dinitrofenol. el BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) y el *Corynebacterium parvum* son coadyuvantes humanos potencialmente útiles que pueden emplearse si el polipéptido de la sustancia purificado se administra a individuos inmunológicamente comprometidos con el fin de estimular la defensa sistémica.

El suero del animal inmunizado se recoge y se trata según procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales hacia un epitopo obtenible a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención contiene anticuerpos hacia otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para

PATRICIA KOCH MORENO
INGLÉS Y ... MAN
C. ... 113
MADRID
Telf. ...

producir y procesar los antisueros policlonales son conocidas en la técnica. Para poder preparar dichos anticuerpos, la invención proporciona también polipéptidos de la invención o fragmentos de éstos haptenizados por otro polipéptido para uso como inmunógenos en animales o humanos.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia epitopos obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención pueden producirse fácilmente por un experto en la técnica. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas es bien conocida. Pueden crearse líneas celulares de producción de anticuerpos inmortales por fusión celular, y también por otras técnicas como transformación directa de linfocitos B con DNA oncogénico, o transfección con virus Epstein-Barr. Pueden rastrearse los paneles de anticuerpos monoclonales producidos frente a epitopos de órbita para determinar diversas propiedades, es decir, la afinidad de isotipo y epitopo.

Los anticuerpos monoclonales de la sustancia y/o agente identificado de la presente invención pueden prepararse utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares

MORENO
AN
113
MADRID

1694

continuas en cultivo. Estas incluyen, aunque no están limitadas a ellas, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Koehler y Millstein (1975 Nature 256:495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., (1983) Immunol. Today 4:72, Cote et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-2030) y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc., pág. 77-96). Además, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", así como para la separación de genes de anticuerpo de ratón de genes de anticuerpo humanos para obtener una molécula con especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas (Morrison et al. (1984) Prc. Natl, Acad. Sci. 81:6851-6855, Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608, Takeda et al (1985) Nature 314:452-454). Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de Estados Unidos n° 4.946.779) pueden adaptarse para producir los anticuerpos de cadena sencilla específicos de la sustancia.

Los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, que están dirigidos hacia epitopos obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención son particularmente útiles en diagnóstico, y aquellos que

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

son neutralizantes son útiles en inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales, en particular, pueden utilizarse para excitar anticuerpos anti-idiotipo. Los anticuerpos anti-idiotipo son inmunoglobulinas que llevan una "imagen interna" de la sustancia y/o agente frente al que se desea protección.

Las técnicas para excitar anticuerpos anti-idiotipo son conocidas en la técnica. Estos anticuerpos anti-idiotipo pueden ser útiles también en terapia.

Los anticuerpos pueden producirse también por inducción de la producción in vivo de la población de linfocitos o por rastreo de bibliotecas de inmunoglobulinas recombinantes o paneles de reactivos de unión altamente específicos como se describen en Orlandi et al. (1989, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3822-3837) y Winter, G., y Milstein, C. (1991, Nature, 349:293-299).

También pueden generarse fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específica para la sustancia. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, aunque no están limitados a ellos, los fragmentos $F(ab')_2$ que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab que pueden generarse por

PATRICIA HOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

1696

reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Como alternativa, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab para permitir una rápida y sencilla identificación de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse W.D., et al., (1989) Science 256:1275-128 1).

SEÑALIZADORES

Puede utilizarse una amplia variedad de señalizadores en los procedimientos de ensayo (así como en los rastreos) de la presente invención, proporcionando los señalizadores preferidos señales convenientemente detectables (por ejemplo por espectroscopía). Como ejemplo, un gen señalizador puede codificar una enzima que cataliza una reacción que altera las propiedades de absorción de luz.

Ejemplos de moléculas señalizadoras incluyen, aunque no están limitadas a ellas, β-galactosidasa, invertasa, proteína de fluorescencia verde, luciferasa, cloranfenicol, acetiltransferasa, β-glucuronidasa, exo-glucanasa y glucoamilasa. Como alternativa, pueden incorporarse nucleótidos marcados radiactivamente o marcados fluorescentemente a transcriptos nacientes que se identifican después cuando se unen a las sondas de

PATRICIA ... MORENO
... MAN
... 113
... MADRID
Telé...

oligonucleótidos.

En una realización preferida, la producción de la molécula de señalizador se mide por la actividad enzimática del producto del gen señalizador, como la β-galactosidasa.

Se conocen en la técnica una serie de protocolos para detectar y medir la expresión de la diana, tal como utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos de la proteína. Los ejemplos incluyen enzimoinmunoensayo (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas fluorescentes (FACS). Se prefiere un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales de dos sitios, que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos con dos epitopos no interferentes en polipéptidos, pero puede emplearse un ensayo de unión competitiva. Estos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, en Hampton R., et al. (1990), Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul MN) y Maddox D.E. e'al., (1983 , J. Exp. Med. 15 8:121 1).

Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de técnicas de marcaje y conjugación que pueden utilizarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir hibridación marcada o sondas PCR para

[illegible] MORENO
[illegible] 113
ADRID
Telé.

detectar las secuencias del polinucleótido diana incluyen el marcaje de oligonucleótidos, traducción por muescas, marcaje terminal o amplificación por PCR utilizando un oligonucleótido marcado. Como alternativa, la secuencia de codificación, o cualquier porción de ella, puede clonarse en un vector para la producción de una sonda de mRNA. Dichos vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles y pueden utilizarse para sintetizar sondas de RNA in vitro por adición de una polimerasa de RNA apropiada como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados.

Una serie de compañías como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp. (Cleveland, OH) suministran estuches comerciales y protocolos para estos procedimientos. Las moléculas señalizadoras o marcadores adecuadas incluyen radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que explican el uso de dichos marcadores incluyen los documentos US-A-3817837, US-A-3850752, US-A-3939350, US-A-3996345, US-A-4277437, US-A-4275149 y US-A-4366241. Además, las inmunoglobulinas recombinantes pueden producirse como se muestra en el documento US-A-4816567.

MORENO
AN
113
MADRID

Los procedimientos adicionales para cuantificar la expresión de una molécula particular incluyen el marcaje radiactivo (Melby, P.C., et al. 1993, J. Immunol. Methods 159:235-44) o la biotinilación (Duplaa, C.et al., 1993, Anal. Biochem. 229-36) de nucleótidos, la coamplificación de un ácido nucleico control y curvas estándar en las que se interpolan los resultados experimentales. La cuantificación de muestras múltiples puede acelerarse realizando el ensayo en formato ELISA, en el que el oligómero de interés se presenta a varias diluciones y la respuesta espectrofotométrica o calorimétrica proporciona una rápida cuantificación.

Aunque la presencia/ausencia de expresión de un gen marcador sugiere que el gen de interés está también presente, su presencia y su expresión deben confirmarse. Por ejemplo, si la secuencia de nucléotidos se inserta en una secuencia de un gen marcador, las células recombinantes que contienen el mismo pueden identificarse por la ausencia de la función del gen marcador. Como alternativa, un gen marcador puede colocarse en tándem con una secuencia de codificación diana bajo el control de un promotor simple. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o selección indica habitualmente la expresión de la diana también.

MORENO
MADRID

Como alternativa, las células huésped que contienen la secuencia de codificación para la diana y que expresan las regiones de codificación de la diana pueden identificarse mediante una serie de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, aunque no están limitados a ellos, la hibridación DNA-DNA o DNA-RNA y la técnica de bioensayo o inmunoensayo de proteínas, que incluyen tecnologías basadas en membrana, basadas en disoluciones o basadas en chips para la detección y/o cuantificación del ácido nucleico o de la proteína.

## ENSAYOS GENERALES DE LA ACTIVIDAD/NIVELES DE cAMP

Puede determinarse la capacidad de un agente de ensayo para potenciar el cAMP midiendo un aumento o reducción relevante de un nivel diana. Además, o como alternativa, puede determinarse la capacidad de un agente de ensayo para potenciar el cAMP midiendo un aumento relevante de los niveles de cAMP. Como ejemplo, pueden adaptarse las explicaciones de Smith et al., 1993 (Appl. Biochem. Biotechol., 41:189-218). Existen también estuches de inmunoensayo disponibles comercialmente para la medida del cAMP (por ejemplo Amersham International, Arlington Heights, IL y DuPont, Boston, MA). Se proporcionan los

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]AN
c. [illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. 51[illegible]

detalles de un ensayo de cAMP adecuado en la sección experimental.

RASTREOS

Puede utilizarse cualquiera de uno o más dianas adecuadas, como una seuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos, para identificar un $P_{cAMP}$ en cualquiera de una serie de técnicas de rastreo de medicamentos. La diana empleada en dicho ensayo puede estar libre en disolución, fijada a un soporte sólido, portada sobre una superficie celular o localizada intracelularmente. La diana puede estar incluso en un modelo animal, pudiendo ser dicha diana una diana exógena o una diana introducida. El modelo animal será un modelo animal no humano. Puede medirse la anulación de la actividad de la diana o la formación de complejos de unión entre la diana y el agente a ensayar.

Las técnicas de rastreo de medicamentos pueden basarse en el procedimiento descrito en Geysen, solicitud de patente europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. En resumen, se sintetiza un gran número de diferentes compuestos de ensayo peptídicos pequeños sobre un sustrato sólido, como puntas de plástico o alguna otra superficie. Se hacen reaccionar los compuestos peptídicos de ensayo con

PATRICIA KOCH MORENO
113
MADRID

una diana adecuada o fragmento de ésta y se lavan. Se detectan entonces las entidades unidas, por ejemplo por procedimientos de adaptación adecuados bien conocidos en la técnica. También pueden recubrirse directamente con una diana purificada placas para uso en técnicas de rastreo de medicamentos. Como alternativa, pueden utilizarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

Esta invención contempla también el uso de ensayos de rastreo de medicamentos competitivos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a una diana compiten específicamente con un compuesto de ensayo para la unión a la diana.

Otra técnica de rastreo proporciona un rastreo de alto rendimiento (HTS) de agentes con afinidad de unión adecuada hacia las sustancias y está basado en el procedimiento descrito en el documento WO 84/03564.

Se espera que los procedimientos de ensayo de la presente invención sean adecuados para el rastreo tanto a pequeña como a gran escala de los compuestos de ensayo, así como en ensayos cuantitativos.

PATRICIA ... MORENO
... MAN
... 113
... ADRID
Tel...

De esta manera, la presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian el cAMP, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de cAMP.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian selectivamente el cAMP en genitales sexuales femeninos, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada de los genitales sexuales femeninos con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de cAMP.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian el cAMP, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de la diana.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian selectivamente el cAMP en genitales sexuales femeninos, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada de los genitales sexuales femeninos con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de la diana.

PATRICIA ... MORENO
ING. ... AN
C ... 113
... ADRID
Telé...

En un aspecto preferido, el rastreo de la presente invención comprende al menos las siguientes etapas (que no tienen porqué estar en este mismo orden consecutivo): (a) realizar un rastreo in vitro para determinar si un agente candidato tiene la actividad relevante (tal como por modulación de PDEII y/o NEP, como NEP de riñón de perro), (b) realizar uno o más rastreos selectivos para determinar la selectividad del citado agente candidato (por ejemplo para ver si el citado agente es también un inhibidor de ACE, utilizando, por ejemplo, el protocolo de ensayo presentado en la presente) y (c) realizar un rastreo in vivo con el citado agente candidato (por ejemplo utilizando un modelo animal funcional). Típicamente, si el citado agente candidato pasa el rastreo (a) y el rastreo (b), se realiza el rastreo (c).

## DIAGNOSTICOS

La presente invención proporciona también una composición o estuche de diagnóstico para la detección de una predisposición al FSAD. A este respecto, la composición o estuche comprenderá una entidad que es capaz de indicar la presencia de uno o más, o incluso la ausencia de uno o más, de las dianas en una muestra de ensayo. Preferiblemente, la muestra de ensayo se obtiene a partir de genitales

PATRICIA ... MORENO
ING ... AN
... MADRID
Telf.

sexuales femeninos o de una secreción de éstos.

Como ejemplo, la composición de diagnóstico puede comprender cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente o una variante, homólogo, fragmento o derivado de éstos, o una secuencia capaz de hibridarse con toda o con una parte de cualquiera de las secuencias de nucleótidos.

Para proporcionar una base para el diagnóstico de la enfermedad, deben establecerse valores patrón o valores normales de una diana. Esto pueden conseguirse combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con un anticuerpo hacia una diana, en condiciones adecuadas para la formación de complejos, que son bien conocidas en la técnica. La cantidad de formación de complejo patrón puede cuantificarse por comparación con una serie de diluciones de controles positivos en los que se combina una cantidad conocida de anticuerpo con concentraciones conocidas de una diana purificada. Después, los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por FSAD. La desviación entre los valores patrón y los del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible]
MADRID
Telé. [illegible]

Una diana misma, o cualquier parte de ella, puede proporcionar la base para un compuesto de diagnóstico y/o terapéutico. Con fines de diagnóstico, las secuencias de polinucleótidos diana pueden utilizarse para detectar y cuantificar la expresión genética en dolencias, trastornos o enfermedades en las que pueda estar implicada el FSAD.

La secuencia de polinucleótidos que codifica la diana puede utilizarse para el diagnóstico del FSAD resultante de la expresión de la diana. Por ejemplo, las secuencias de polinuclétidos que codifican una diana pueden utilizarse en ensayos de hibridación o de PCR de tejidos procedentes de biopsias o autopsias o fluidos biológicos, para detectar anormalidades en la expresión de la diana. La forma de dichos procedimientos cuantitativos o cualitativos puede incluir análisis Southern o Northern, transferencia por puntos u otras tecnologías basadas en membrana, tecnologías PCR, varillas de sondeo, tecnologías de puntas o chips, y ELISA u otras tecnologías de formato de múltiples muestras. Todas estas técnicas son bien conocidas en la técnica y son de hecho la base de muchos estuches de diagnóstico comercialmente disponibles.

Dichos ensayos pueden ajustarse para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico particular y

PATRICIA KOCH MORENO
INO... MAN
C ... 113
Telf. 51... MADRID

pueden utilizarse en estudios animales, en ensayos clínicos o para monitorizar el tratamiento de un paciente individual. Para proporcionar una base para el diagnóstico de una enfermedad debe establecerse un perfil normal o patrón para la expresión de la diana. Esto se consigue combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con la diana o una porción de ésta, en condiciones adecuadas para la hibridación o amplificación. La hibridación patrón puede cuantificarse por comparación de los valores obtenidos de sujetos normales con una serie de diluciones de controles positivos ensayados en el mismo experimento, en que se utiliza una cantidad conocida de diana purificada. Los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por un trastorno o enfermedad relacionado con la expresión de la secuencia de codificación de la diana. La desviación entre los valores patrón y los del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad. Si se establece la enfermedad, se administra un agente terapéutico existente y pueden generarse valores o perfiles de tratamiento. Finalmente, puede repetirse el ensayo regularmente para evaluar si los valores se alejan o se acercan al esquema normal o patrón. Los perfiles de tratamiento sucesivos pueden utilizarse para mostrar la

PATRICIA KOCH MORENO
AN
MADRID
Telé.

eficacia del tratamiento durante un periodo de varios días o varios meses.

De esta manera, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido diana o variante, homólogo, fragmento o derivado de éste, para producir anticuerpos anti-diana que pueden, por ejemplo, utilizarse como diagnóstico para detectar y cuantificar los niveles de diana en estados de FSAD.

La presente invención proporciona también ensayos y estuches de diagnóstico para la detección de una diana en células y tejidos, que comprenden una diana purificada que puede utilizarse como control positivo, y anticuerpos anti-diana. Dichos anticuerpos pueden utilizarse en tecnologías basadas en disoluciones, basadas en membrana o basadas en tejidos para detectar cualquier estado de enfermedad o dolencia relacionado con la expresión de la proteína diana o con la expresión de las deleciones o de una variante, homólogo, fragmento o derivado de éste.

## PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO

Las composiciones y/o procedimientos y/o estuches de diagnóstico pueden utilizarse en las siguientes técnicas

PATRICIA [illegible] MORENO
ING[illegible]AN
[illegible]
Tel[illegible] [illegible]DRID

que incluyen, aunque no están limitadas a ellos, ensayos competitivos y no competitivos, radioinmunoensayo, ensayos de bioluminiscencia y quimioluminiscencia, ensayos fluorométricos, ensayos de "en sandwich", ensayos inmunorradiométricos, transferencia por puntos, ensayos ligados a enzimas, incluyendo ELISA, placas de microensayo, bandas recubiertas de anticuerpos o varillas de sonda para una rápida monitorización de la orina o sangre, inmunoquímica e inmunocitoquímica.

Como ejempo, un estuche inmunohistoquímico puede utilizarse también para la localización de actividad NEP, PDE o NPY en tejido genital. Este estuche de inmunohistoquímica permite la localización de NEP, PDE o NPY en secciones de tejido y en células cultivadas utilizando tanto microscopía óptica como electrónica, que puede utilizarse con fines tanto de investigación como clínicos. Dicha información puede ser útil para diagnóstico y posiblemente para fines terapéuticos en la detección y/o prevención y/o tratamiento de la FSD, como FSAD. Para cada estuche se establecen un intervalo, sensibilidad, precisión, fiabilidad, especificidad y reproducibilidad del ensayo. La variación intraensayo e interensayo se establece en los puntos al 20%, 50% y 80% de las curvas estándar de desplazamient o actividad.

PATRICIA KOCH MORENO
...AN
...RID
Telf.

SONDAS

Otro aspecto de la invención en cuestión es la provisión de sondas de hibridación de ácidos nucleicos o de PCR que son capaces de detectar (especialmente aquellas que son capaces de seleccionar selectivamente) secuencias de polinucleótidos, incluyendo secuencias genómicas, que codifican una región de codificación de la diana o moléculas estrechamente relacionadas, como alelos. La especificidad de la sonda, es decir, si deriva de una región o dominio altamente conservado, conservado o no conservado, y el rigor de la hibridación o amplificación (alto, intermedio, bajo) determinarán si la sonda identifica sólo las secuencias de codificación de la diana de origen natural, o secuencias relacionadas. Las sondas de detección de secuencias de ácidos nucleicos relacionados se seleccionan de regiones de nucléótidos conservadas o altamente conservadas de los miembros de la familia de la diana y dichas sondas pueden utilizarse en un conjunto de sondas degeneradas. Para la detección de secuencias de ácidos nucleicos idénticas, o cuando se desea una máxima especificidad, las sondas de ácidos nucleicos se seleccionan de regiones de nucleótidos no conservadas o regiones únicas de los polinucleótidos diana. Como se utiliza en la presente, el término "región de nucleótidos

PATRICIA KOEHN MORENO
AN
INO
MADRID
Tel.

no conservada" se refiere a un región de nucleótisos que es única en una secuencia de codificación de la diana descrita en la presente y que no aparece en miembros de la familia relacionados.

La PCR, como se describre en los documentos US-A-4683195, US-A-4800195 y US-A-4965188, proporciona usos adicionales para los oligonucleótidos basados en secuencias diana. Dichos oligonucleótidos generalmente se sintetizan químicamente, pero pueden generarse enzimáticamente o producirse a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros comprenden generalmente dos secuencias de nucleótidos, una de orientación con sentido (5'->3') y otra de orientación sin sentido (3'->5') empleadas en condiciones optimizadas para la identificación de un gen o estado específico. Estos dos mismos oligómeros, conjuntos encargados de oligómeros, o incluso un conjunto degenerado de oligómeros, pueden emplearse en condiciones menos rigurosas para la detección y/o cuantificación de secuencias de DNA o RNA estrechamente relacionadas.

La secuencia de ácidos nucleicos para una diana puede utilizarse también para generar sondas de hibridación, como se ha descrito anteriormente, para mapear la secuencia genómica endógena. La secuencia puede mapearse en un

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
ING [illegible]
C [illegible] ADRID
Telf. [illegible]

cromosoma particular o en una región específica del cromosoma utilizando técnicas bien conocidas. Estas incluyen hibridación in situ para dispersiones cromosómicas (Verma et al. (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York City), preparaciones cromosómicas con clasificación de flujo o construcciones de cromosomas artificiales como YAC, cromosomas bacterianos artificiales (BAC), construcciones bacterianas PI o bibliotecas de cDNA de cromosomas simples.

La hibridación in situ de preparaciones cromosómicas y las técnicas de mapeo físico, como el análisis de ligamiento utilizando marcadores cromosómicos establecidos, son inestimables en la extensión de los mapas genéticos. Pueden encontrarse ejemplos de mapas genéticos en Science (1995, 270:410 y siguientes y 1994, 265:1981 y siguientes). A menudo, la posición de un gen en un cromosoma de otra especie de mamífero puede revelar marcadores asociados incluso si el número o el brazo de un cromosoma humano particular no es conocido. Pueden asignarse nuevas secuencias a los brazos cromosómicos, o a partes de éstos, por mapeo físico. Esto proporciona información valiosa a los investigadores que buscan los genes de las enfermedades utilizando clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Una vez se ha localizado

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible]
MADRID

aproximadamente una enfermedad o síndrome por ligamiento genético a una región genómica particular, cualquier mapeo de secuencias de ese área puede representar genes asociados o reguladores para investigaciones posteriores. La secuencia de nucleótidos objeto de la invención puede utilizarse también para detectar diferencias en la localización cromosómica debida a translocación, inversión, etc., entre individuos normales, portadores o afectados.

## CELULAS HUESPED

El término "célula huésped" en relación con la presente invención incluye cualquier célula que podría comprender la diana del agente de la presente invención.

De esta manera, otra realización de la presente invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas con un polinucleótido que es o que expresa la diana de la presente invención. Preferiblemente, el citado polinucleótido se lleva en un vector de replicación y expresión de los polinucleótidos que son la diana o que expresan la diana. Las células se elegirán para que sean compatibles con el citado vector y pueden ser por ejemplo células procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levadura o de plantas.

PATRICIA ROCH MORENO
MADRID

La bacteria gram-negativa *E. coli* se utiliza ampliamente como huésped para la expresión de genes heterólogos. Sin embargo, tienden a acumularse grandes cantidades de proteína heteróloga dentro de la célula. La purificación posterior de la proteína deseada de las proteínas intracelulares de *E. coli* en bruto puede ser difícil a veces.

En contraposición con *E. coli*, las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como huéspedes heterólogos por su capacidad de segregar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como huéspedes son las de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención, y/o del deseo de un procesamiento posterior de la proteína expresada, pueden preferirse huéspedes eucarióticos como levaduras u otros hongos. En general, se prefieren las células de levadura frente a las células fúngicas porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas las segregan mal las células de levadura, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo hiperglicosilación en levadura). En estos casos, debe seleccionarse un organismo huésped fúngico diferente.

PATRICIA KOCH MORENO
MAN
ING
DRII
Tel

Ejemplos de huéspedes de expresión adecuados dentro del alcance de la presente invención son hongos como la especie *Aspergillus* (como las descritas en el documento EP-A-0184438 y EP-A-0284603) y especie *Trichoderma*, bacterias como la especie *Bacillus* (como las descritas en los documentos EP-A-0134048 y EP-A-0253455), la especie *Streptomyces* y especie *Pseudomonas* y levaduras como la especie *Kluyveromyces* (como las descritas en los documentos EP-A-0096430 y EP-A-0301670) y la especie *Saccharomyces*. Como ejemplo, los huéspedes de expresión típicos pueden seleccionarse de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger var. tubigensis*, *Aspergillus niger var. awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus orvzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

El uso de células huésped adecuadas, como células huésped de levaduras, hongos y plantas, puede proporcionar modificaciones post-transcripcionales (por ejemplo miristoilación, glicosilación, truncado, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) como puede ser necesario para conferir una actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinante de la presente invención.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

## ORGANISMO

El término "organismo" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que podría comprender la diana según la presente invención y/o productos obtenidos de ésta. Los ejemplos de organismos pueden incluir un hongo, levadura o planta.

El término "organismo transgénico" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprende la diana según la presente invención y/o los productos obtenidos.

## TRANSFORMACION DE CELULAS HUESPED/ORGANISMOS HUESPED

Como se indicó anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las explicaciones sobre la transformación de huéspedes procarióticos está bien documentada en la técnica, por ejemplo véase Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
[illegible] MADRID
Telf: [illegible]

Si se utiliza un huésped procariótico, puede ser necesario modificar la secuencia de nucleótidos adecuadamente antes de la transformación, tal como por eliminación de intrones.

En otra realización, el organismo transgénico puede ser una levadura. A este respecto, las levaduras también se han utilizado ampliamente como vehículo para la expresión de genes heterólogos. La especie *Saccharomyces cerevisiae* tiene una larga historia de uso industrial, incluyendo su uso para la expresión de genes heterólogos. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido revisada por Goodey et al (1987, Yeast Biotechnology, D.R. Berry et al., eds., pág. 401-429, Allen y Unwin, Londres) y por King, et al. (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E.F. Walton y G.T. Yarronton, eds., pág. 107-133, Blackie, Glasgow).

Por varias razones, *Saccharomyces cerevisiae* es adecuada para la expresión de genes heterólogos. En primer lugar, no es patogénica para humanos y es incapaz de producir ciertas endotoxinas. En segundo lugar, tiene una larga historia de uso seguro durante siglos de explotación comercial con varios fines. Esto ha llevado a una amplia aceptación del público. En tercer lugar, el uso comercial e investigación dedicadas al organismo ha dado como

PATRICIA KOCH MORENO
ING MAN
13
ADRID
Teléf.

resultado una riqueza de conocimientos sobre su genética y fisiología así como sobre las características de fermentación a gran escala de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se proporciona una revisión de los principios de la expresión de genes heterólogos en Sacccharomyces cerevisiae y de la secreción de productos genéticos en H. Hinchcliffe, E. Kenny (1993, "Yeast as a vehicule for the expression of heterologous genes", Yeasts, vol 5, Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, eds., 2ª edición, Academic Press Ltd.).

Están disponibles varios tipos de vectores de levaduras, incluyendo vectores integradores, que necesitan la recombinación con el genoma del huésped para su mantenimiento y la replicación autónoma en vectores plásmidos.

Para preparar Saccharomyces transgénica, se preparan las construcciones de expresión por inserción de la secuencia de nucleótidos de la presente invención en una construcción diseñada para la expresión en levadura. Se han desarrollado varios tipos de construcciones utilizadas para la expresión heteróloga. Las construcciones contienen un promotor activo de levadura fusionado con la secuencia de nucleótidos de la presente invención, habitualmente se utiliza un promotor

PATRICIA [illegible] MORENO
ING[illegible] AN
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

proveniente de levadura, como el promotor GAL1. Habitualmente se utiliza una secuencia señal proveniente de levadura, como la secuencia que codifica el péptido señal SUC2. Un terminador activo de levadura termina el sistema de expresión.

Para la transformación de levaduras se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, puede prepararse una Saccharomyces transgénica según la presente invención siguiendo las expliaciones de Hinnen et al. (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929), Beggs, J.D. (1978, Nature, Londres, 275, 104) e Ito, H. et al. (1983, J. Bacteriology 153, 163-168).

Las células de levadura transformadas se seleccionan utilizando diversos marcadores selectivos. Entre los marcadores utilizados para la transformación existe una serie de marcadores auxotróficos como LEU2, HIS4 y TRP1, y marcadores de resistencia a antibióticos dominantes como marcadores del antibiótico aminoglicósido, por ejemplo G418.

Otro organismo huésped es una planta. El principio básico en la construcción de plantas genéticamente modificadas es insertar información genética en el genoma de la planta de

PATRICIA KOCH MORENO

modo que se obtenga un mantenimiento estable del material genético insertado. Existen algunas técnicas para la inserción de información genética, siendo las dos principales la introducción directa de la información genética y la introducción de la información genetica mediante el uso de un sistema de vector. Puede encontrarse una revisión de las técnicas generales en artículos de Potrykus (Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech Marzo/abril 1994 17-27). Pueden encontrarse otras explicaciones sobre transformación de plantas en el documento EP-A-0449375.

De esta manera, la presente invención proporciona también un procedimiento de transformación de una célula huésped con una secuencia de nucleótidos que debe ser la diana o que debe expresar la diana. Las células huésped transformadas con la secuencia de nucleótidos pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede segregarse o puede contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector utilizado. Como comprenderán los expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación pueden diseñarse

PATRICIA BACH MORENO
. . . MADRID
Teléf.

con secuencias señal que dirijan las secreción de las secuencias de codificación a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular. Otras estructuras recombinantes pueden unir la secuencia de codificación a la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de las proteínas solubles (Kroll D.J. et al, (1993), DNA Cell. Biol. 12:441-53).

## COMPOSICIONES FARMACEUTICAS

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo combinaciones de éstos).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria y comprenderá típicamente uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos o diluyentes para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen en, por ejemplo Pharmaceutical Sciences de Remington, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit., 1985). La selección del vehículo, excipiente o

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

diluyente farmacéutico puede hacerse con respecto a la vía prevista de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmaceúticas pueden comprender como vehículo, excipiente o diluyente, además de los mismos, cualquier ligante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento o agente(s) de solubilización.

Pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, tintes y agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido para-hidroxibenzoico. También pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión.

Puede haber diferentes requerimientos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de suministro. Como ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para suministrarse utilizando una minibomba o por vía mucosa, por ejemplo en forma de un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o disolución ingerible, o parenteralmente, en la que la composición se formula en una forma inyectable para suministro, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Como alternativa, la formulación puede diseñarse para ser suministrada por ambas

MORENO
MADRID
Telé.

vías.

Cuando el agente se va a suministrar por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debería ser capaz de permancer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal, por ejemplo debería ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detersorios de la bilis.

Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inhalación, en forma de supositorio o de pesario, tópicamente en forma de una loción, disolución, crema, ungüento o polvo, utilizando un parche dérmico, oralmente en forma de comprimidos que contienen excipientes como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, disoluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse preferiblemente en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o monosacáridos suficientes para hacer la disolución isotónica con la sangre. Para la administración bucal o

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas que pueden formularse de manera convencional.

Para algunas realizaciones, los agentes de la presente invención pueden utilizarse también en combinación con una ciclodextrina. Las ciclodextrinas se sabe que forman complejos de inclusión y de no inclusión con moléculas de medicamento. La formación de un complejo medicamento-ciclodextrina puede modificar las propiedades de solubilidad, velocidad de disolución, biodisponibilidad y/o estabilidad de una molécula de medicamento. Los complejos medicamento-ciclodextrina son generalmente útiles para la mayoría de las formas de dosificación y vías de administración. Como alternativa a la complejación directa con el medicamento, la ciclodextrina puede utilizarse como un aditivo auxiliar, por ejemplo como un vehículo, diluyente o solubilizante. Las alfa, beta y gammciclodextrinas son las utilizadas más habitualmente y se describen ejemplos adecuados en los documentos WO-A-91/11172, WO-A-94/02518 y WO-A-98/55148.

En una realización preferida, los agentes de la presente invención se suministran sistémicamente (como por vía oral, bucal, sublingual), más preferiblemente por vía oral.

PATRICIA LUCH MORENO
.AN
RID
Tel.

Por ello, el agente está preferiblemente en una forma que es adecuada para suministro oral.

Para algunas realizaciones el agente, cuando se utiliza, preferiblemente no actúa sobre el sistema nervioso central.

Para algunas realizaciones el agente, cuando se utiliza, preferiblemente es de actuación periférica.

## ADMINISTRACION

El término "administrado" incluye el suministro por técnicas víricas o no víricas. Los mecanismos de suministro vírico incluyen, aunque no están limitados a ellos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores víricos de herpes, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos y vectores baculovíricos. Los mecanismos de suministro no vírico incluyen transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, compuestos anfifílicos faciales catiónicos (CFA) y combinaciones de éstos.

Los agentes de la presente invención pueden administrarse por separado, pero generalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, por ejemplo cuando el

PATRICIA [illegible] MORENO
...RID
Tel

agente está mezclado con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado con respecto a la vía prevista de administración y a la práctica farmacéutica estándar.

Pro ejemplo, el agente puede administrarse (por ejemplo oral o tópicamente) en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, por pulsos o controlada.

Los comprimidos pueden contener excipientes como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio y glicina, disgregantes como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos y ligantes de granulación como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además pueden incluirse agentes lubricantes como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo

PATRICIA [illegible] MORENO

similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para las suspensiones acuosas y/o elixires, el agente puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, material colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de éstos.

Las vías de administración (suministro) incluyen, aunque no están limitadas a las mismas, una o más de: oral (por ejemplo en forma de comprimido, cápsula o en forma de disolución ingerible), tópica, mucosa (por ejemplo en forma de pulverizador nasal o aerosol para inhalación), nasal, parenteral (por ejemplo en una forma inyectable), gastrointestinal, intraespinal, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intrauterina, intraocular, intradérmica, intracraneal, intratraqueal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutánea, oftálmica (incluyendo intravitreal o intracameral), transdérmica, rectal, bucal, vaginal, epidural y sublingual.

Se comprenderá que no todo el agente necesita administrarse

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] RID

por la misma vía. Probablemente, si la composición comprende más de un componente activo, esos componentes pueden administrarse por vías diferentes.

Si el agente de la presente invención se administra parenteralmente, los ejemplos de dicha administración incluyen uno o más de: administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intrasternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea del agente, y/o utilizando técnicas de infusión.

Para la administración parenteral, el agente se utiliza mejor en la forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o glucosa suficiente para hacer la disolución isotónica con la sangre. Las disoluciones acuosas deberán estar adecuadamente tamponadas (preferiblemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se consigue fácilmente por ténicas farmacéuticas estándar conocidas por los expertos en la técnica.

Como se ha indicado, el agente de la presente invención puede administrarse intranasalmente o por inhalación y se

MORENO

suministra convenientemente en forma de una presentación de inhalador de polvo seco o de aerosol pulverizador de envase a presión, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un impulsor adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A™) o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA™), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la dosis unitaria puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. El envase a presión, bomba, pulverizador o nebulizador puede contener una disolución o un suspensión del compuesto activo, por ejemplo utilizado una mezcla de etanol y el impulsor como disolvente, que puede contener además un lubricante, por ejemplo trioleato de sorbitano. Las cápsulas y cartuchos (preparados por ejemplo a partir de gelatina) para uso en un inhalador o insuflador, pueden formularse para contener una mezcla de polvos del agente y una base en polvo adecuada como lactosa o almidón.

Como alternativa, el agente de la presente invención puede administrarse en forma de supositorio o de pesario, o puede aplicarse tópicamente en forma de un gel, hidrogel, loción, disolución, crema, ungüento o polvo. El agente de la

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] RID
Telé. [illegible]

presente invención puede administrarse también por vía dérmica o transdérmica, por ejemplo mediante el uso de un parche dérmico. También puede administrarse por vía pulmonar o rectal. También puede administrarse por vía ocular. Para uso oftálmico, los compuestos pueden formularse como suspensiones micronizadas en suero salino isotónico de pH ajustado o, preferiblemente, como disoluciones en suero salino estéril isotónico con pH ajustado opcionalmente, en combinación con un conservante como cloruro de bencilalconio. Como alternativa, puede formularse en forma de ungüento tal como vaselina.

Para la aplicación tópica a la piel, el agente de la presente invención puede formularse como un ungüento adecuado que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulsionadora y agua. Como alternativa, puede formularse como una loción o crema adecuada, suspendida o disuelta en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoesteraro de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de cetilésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
ING [illegible] Y
C [illegible] MADRID
Telé: [illegible]

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por inyección directa.

Para algunas aplicaciones, el agente preferiblemente se administra oralmente.

Para algunas aplicaciones, el agente preferiblemente se administra tópicamente.

NIVELES DE DOSIS

Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual. El nivel específico de dosis y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente en particular pueden variar y dependerán de una serie de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, modo y momento de administración, la tasa de excreción, la combinación de medicamentos, la gravedad de la dolencia particular y la terapia individual experimentada. El agente y/o composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse según un régimen de 1 a 10 veces al día, tal como una o dos veces al día.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

Para administración oral y parenteral a pacientes humanos, el nivel de dosificación diario del agente puede ser en dosis simples o divididas.

Dependiendo de la necesidad, el agente puede administrarse a una dosis desde 0,01 a 30 mg/kg de peso corporal, tal como de 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal. Naturalmente, las dosificaciones mencionadas en la presente son ilustrativos del caso medio. Puede haber casos individuales, por supuesto, en que sean necesarios intervalos de dosificación mayores o menores.

## FORMULACION

Los agentes de la presente invención pueden formularse en una composición farmacéutica, tal como por mezcla de uno o más vehículos, diluyentes o excipientes adecuados, mediante técnicas que son conocidas en la técnica.

A continuación se presentan algunos ejemplos no limitantes de formulaciones.

Formulación 1: Se prepara un comprimido utilizando los siguientes ingredientes:

PATRICIA [illegible] MORENO
ING [illegible]
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

| | peso/mg |
|---|---|
| Agente | 250 |
| Celulosa microcristalina | 400 |
| Dióxido de silicio, pirólisis | 10 |
| Acido esteárico | 5 |
| Total | 665 |

se mezclan los componentes y se comprimen para formar comprimidos de 665 mg de peso cada uno.

Formulación 2: Una formulación intravenosa puede prepararse como sigue:

| | |
|---|---|
| Agente | 100 mg |
| Suero salino isotónico | 1.000 ml |

SAL FARMACEUTICAMENTE ACTIVA

El agente de la presente invención puede administrarse como una sal farmacéuticamente aceptable. Típicamente, una sal farmacéuticamente aceptable puede prepararse fácilmente utilizando un ácido o base deseado, según sea apropiado. La sal puede precipitar de la disolución y recogerse por filtración o puede recuperarse por evaporación del disolvente.

PATRICIA ... MORENO
ING ... AN
Tel.

MODELOS DE ENSAYO ANIMAL

Pueden utilizarse modelos in vivo para investigar y/o diseñar terapias o agentes terapéuticos para tratar FSAD. Los modelos podrían utilizarse para investigar el efecto de diversas herramientas/compuestos líder sobre una serie de parámetros que indican la respuesta de excitación sexual. Estos modelos de ensayo animal pueden utilizarse como ensayo de la presente invención o en el mismo. El modelo de ensayo animal será un modelo de ensayo animal no humano.

Existe una serie de modelos animales para la disfunción sexual femenina vasculogénica (FSAD) disponibles que pueden utilizarse.

Como ejemplo, puede hacerse referencia a modelos animales invasivos (por ejemplo véase Park et al., 1997). En este caso, las respuestas hemodinámicas vaginal y clitorídea pueden registrarse directamente a continuación de la estimulación del nervio pélvico en conejos hembras normales y ateroscleróticos (un modelo validado de FSAD). Los efectos in vivo de los potenciadores de cAMP, tales como agentes vasodilatadores como antagonistas NPY o agonistas VIP, pueden investigarse en animales normales o con FSAD.

PATRICIA KOCH MORENO
AN
D

Como otro ejemplo, puede hacerse referencia a modelos animales no invasivos (por ejemplo véase la revisión de Goldstein et al., 1998, Laan et al., 1998). En este caso, la ultrasonografía de onda Doppler por pulsos proporciona el medio para detectar los cambios de flujo sanguíneo en las arterias vaginal y clitorídea. Este modelo puede utilizarse para investigar los efectos vasculogénicos durante la administración de vasodilatadores.

Otras técnicas no invasivas que pueden utilizarse incluyen fotopletismografía vaginal, que proporciona una medida cuantitativa de la congestión de la mucosa vaginal, y técnicas de compensación térmica vaginal, que están basadas en el principio de que los cambios en el flujo sanguíneo vaginal pueden registrarse midiendo la transferencia de calor de una sonda intravaginal mantenida a temperatura constante.

En un aspecto preferido se utiliza un modelo no invasivo de FSAD.

## UN MODELO ANIMAL DE EXCITACION SEXUAL

En los estudios de los presentes autores, se ha desarrollado un modelo reproducible y robusto de la

PATRICIA KOCH MORENO

fisiología de la excitación sexual. Este modelo utiliza un conejo anestesiado y emplea tecnologías de láser Doppler para monitorizar el flujo sanguíneo genital registrando rutinariamente los parámetros cardiovasculares. Se pueden de medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo vaginal (e incluso clitorídeo) inducidos por la estimulación del nervio pélvico o por infusión de VIP en ausencia y en presencia de los agentes de ensayo.

Se cree que dicho modelo animal refleja directamente los datos clínicos. Por ello, este modelo puede utilizarse para estudiar agentes candidatos para el tratamiento de FSAD, midiendo la estimulación del flujo sanguíneo vaginal o clitorídeo.

## MEDIDA FISIOLOGICA DE LA EXCITACION SEXUAL FEMENINA

Según la presente invención, pueden utilizarse una serie de técnicas diferentes para medir el flujo sanguíneo clitorídeo y vaginal. Como ejemplo, puede hacerse uso de fotopletismografía vaginal, técnica de eliminación del calor vaginal, MRI vaginal y clitorídeo de contraste mejorado, imágenes clitorídeas/vulvares por pulsos de láser Doppler y ultrasonografía clitorídea.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible]
Telf. [illegible] MADRID

La cuantificación de la lubricación vaginal puede medirse también por técnicas conocidas en la técnica, como (a) pesados pre- y post-estimulación de tampones vaginales, y (b) medida del pH del fluido vaginal. Con respecto al último aspecto, el medio ácido normal en reposo en la vagina se hace más alcalino al acercarse al pH de la sangre cuando aparece la trasudación de fluido durante la estimulación sexual.

PDE (fosfodiesterasa)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es una PDE (fosfodiesterasa).

Se sabe que los nucleótidos cíclicos, como cAMP y cGMP, son importantes segundos mensajeros intracelulares. Las nucleótido cíclico fosfodiesterasas, también conocidas como PDE, son una familia de enzimas que catalizan la degradación de nucleótidos cíclicos y, al hacerlo, son uno de los componentes celulares que regulan la concentración de nucleótidos cíclicos.

En años recientes, se han definido al menos siete enzimas PDE (como PDEI - PDEVII), así como muchos subtipos de estas enzimas, basándose en la afinidad de sustrato y los

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID

requerimientos de cofactores (Beavo, J.A. y Reifsnyder, D.H., Trends Pharmacol. Sci. 11:150 (1990), Beavo, J., en: Cyclic Nucleotides Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action, Beavo, J. y Housley, M.D. (Eds.) Wiley:Chichester, pág. 3-15 (1990).

Ejemplos de PDE incluyen: PDEI que es una PDE dependiente de $Ca^{2+}$/calmodulina, PDEII que es una PDE estimulada por cAMP y cGMP, PDEIII que es una PDE inhibida por cGMP, PDEIV que es una PDE de alta afinidad específica de cAMP y PDEV que es una PDE específica de cGMP. Las PDEI y restantes se denominan a veces PDE de tipo I, y restantes, o PDE de tipo 1, y restantes.

Cada familia de PDE puede contener dos o más isoformas (es decir puede haber dos o más isoenzimas PDE). Como ejemplo, la PDEIV de mamífero, la homóloga del gen Dunce de *Drosophila* (Chen, C.N. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (EE.UU.) 83:9313 (1986)) se sabe que tiene cuatro isoformas en rata (Swinnen J.V., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (EE.UU.) 86:5325 (1989)). Se sabe también que las PDE humanas aparecen como isoformas y que tienen variantes de corte y empalme. Por ejemplo, se informó de la clonación de una isoforma humana de PDEIV de monocitos en 1990 (Livi G.P. et al., Mol. Cell. Bio., 10:2678 [1990]). Como otro

PATRICIA KOCH MORENO

ejemplo, otros investigadores han clonado independientemente tres variantes de corte y empalme de PDEIV, que se designan ahora como hPDEIV-B1, hPDEIV-B2 y hPDEIV-B3.

Las explicaciones sobre nucleótido cíclico fosfodiesterasas pueden encontrarse también en los documentos US-A-5932423 y US-A-5932465.

Las explicaciones sobre otras nucleótido cíclico fosfodiesterasas, es decir CN PCDE8, pueden encontrarse en el documento WO-A-97/35989. Según el documento WO-A-97/35989, la CN PCDE8 tiene dos isoenzimas, que se designaron CN PCDE8A y CN PCDE8B. El término "isoenzima" se refiere a veces en la técnica como "isoforma".

Según el documento WO-A-97/35989, se han identificado muchos inhibidores de diferentes PDE y algunos han experimentado evaluación clínica. Por ejemplo, los inhibidores de PDEIII se están desarrollando como agentes antitrombóticos, como agentes antihipertensivos y como agentes cardiotónicos útiles en el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva. Se ha utilizado rolipram, un inhibidor de PDEIII, en el tratamiento de la depresión y otros inhibidores de PDEIII están sometidos a

PATRICIA KOCH

evaluación como agentes antiinflamatorios. Se ha mostrado que el rolipram inhibe la TNF-alfa inducida por lipopolisacárido (LPS), que se ha mostrado que estimula la replicación de VIH-1 in vitro. Por lo tanto, el rolipram puede inhibir la replicación de VIH-1 (Angel et al., 1995, AIDS 9:1137-44). Además, basándose en su capacidad para suprimir la producción de TNF alfa y beta y del interferón gamma, el rolipram se ha mostrado eficaz en el tratamiento de encefalomielitis, el modelo animal experimental de esclerosis múltiple (Sommer et al., 1995, Nat. Med. 1:244-248) y puede ser eficaz en el tratamiento de disquinesia tardía (Sasaki et al., 1995, Eur. J. Pharmacol. 282:71-76).

Según el documento WO-A-97/35989, existen también inhibidores de PDE no específicos, como teofilina, utilizada en el tratamiento del asma bronquial y otras enfermedades respiratorias, y pentoxifilina, utilizada en el tratamiento de claudicación intermitente y enfermedades vasculares periféricas inducidas por la diabetes. La teofilina se cree que actúa sobre la función del músculo liso de las vías aéreas así como en una capacidad antiinflamatoria o inmunomodulatoria en el tratamiento de enfermedades respiratorias (Banner et al, 1995, Respir. J. 8:996-1000) donde se cree que actúa inhibiendo la hidrólisis tanto de cAMP CN PDE como de cGMP CN PDE (Banner et al., 1995, Monaldi Arch. Chest. Dis. 50:286-292). La pentoxifilina, también conocida por bloquear la producción de TNF-alfa, puede inhibir la replicación de VIH-1 (Angel et al, supra). Se da una lista de inhibidores de CN PDE en Beavo, 1995, supra.

Se ha sugerido que los inhibidores selectivos de PDE, además de sus isoenzimas y sus isotipos, conducirán a una terapia más eficaz con menos efectos secundarios. Por ejemplo, véanse las explicaciones de las revisiones de Wieshaar R.E., et al., (J. Med. Chem., 28:537[1985]), Giembycz M.A., (Biochem. Pharm., 43:2041 [1992]) y Lowe J.A. y Cheng J.B. (Drugs of the Future, 17:799-807 [1992]).

De esta manera, para algunas aplicaciones es deseable tener una inhibición selectiva de un tipo individual de PDE.

Las explicaciones de los antecedentes sobre las PDE han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a PDE2 o PDE estimulada por cGMP se ha extraído de esa fuente.

> "Los nucleótidos cíclicos funcionan como segundos mensajeros que median una serie de respuestas

PATRICIA KOCH MORENO

celulares ante señales extracelulares como hormonas, luz y neurotransmisores. Las nucleótido cíclico fosfodiesterasas nucleótidos cíclicos (PDE) juegan un papel en la transducción de la señal por regulación de las concentraciones celulares de los nucleótidos cíclicos. Las células de mamíferos contienen múltiples PDE que se distinguen en al menos 7 familias basadas en su afinidad de sustrato y en su sensibilidad selectiva hacia cofactores y medicamentos inhibidores. Estas familias son: (I) PDE dependientes de $Ca^{2+}$/calmodulina, (II) PDE estimuladas por cGMP, (III) PDE inhibidas por cGMP, (IV) PDE específicas de cAMP, (V) PDE específicas de cGMP, (VI) PDE fotoreceptoras y (VII) PDE de alta afinidad específicas de cAMP. A partir de la secuencia de aminoácidos, es evidente que todas estas familias de PDE contienen un dominio relacionado, que se piensa que es el dominio catalítico, con aproximadamente un 30% de identidad de secuencia entre las familias. Los miembros de la misma familia están relacionados más estrechamente, comparten el 60-80% de la identidad de secuencia a lo largo de toda la región de codificación.

Michaeli et al. (1993) establecieron un rastreo funcional altamente sensible para el aislamiento de

Teléf. MADRI

cDNA que codifica cAMP fosfodiesterasas por complementación de los defectos en la cepa Saccharomyces cerevisiae que carece de ambos genes de cAMP PDE endógenos, PDE1 y PDE2. Se aislaron tres grupos de cDNA correspondientes a 3 genes humanos distintos que codificaban PDE específicas de cAMP a partir de una biblioteca de cDNA de glioblastoma humano utilizando este rastreo funcional. Dos de los genes estaban estrechamente relacionados con la PDE específica de cAMP "dunce" de Drosophila. El tercer gen, al que Michaeli et al. (1993) se refirieron como el HCP1, codificaba una nueva PDE específica de cAMP. HCP1 tenía una secuencia de aminoácidos relacionada con las secuencias de los dominios catalíticos de todas las nucleótido cíclico PDE. Es una PDE de alta afinidad específica de cAMP que no comparte otras propiedades de la familia de PDE específicas de cAMP, sin embargo. La actividad PDE de HCP1 no era sensible a cGMP u otros inhibidores de las PDE inhibibles por cGMP. Las propiedades bioquímicas y farmacológicas de HCP1 sugirieron a Michaeli et al. (1993) que era un miembro de una familia de nucleótido ciclico PDE no descubierta anteriormente, que se designó como la familia VII. Los análisis de transferencia Northern indicaron la presencia de altos niveles de RNA de

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
[illegible] MADRID

HCP1 en músculo esquelético humano.

Por análisis de transferencia Southern de líneas celulares híbridas, Milatovich et al. (1994) mapearon el locus de HCP1 en el cromosoma 8, por estudio de las líneas celulares híbridas somáticas que contenían diferentes regiones del cromosoma 8, regionalizaron la asignación de 8q13-q22. Han et al. (1998) mapearon el gen PDE7A en 8q13 mediante fluorescencia de hibridación in situ. Por análisis retrocruzado interespecífico, mapearon el gen Pde7A de ratón en la región proximal del cromosoma 3."

Las explicaciones de los antecedentes sobre PDE2 han sido presentadas por Jennifer P. Macke et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a PDE2 estimulada por cGMP se ha extraido de esa fuente.

"Rosman et al. (1997) clonaron un cDNA correspondiente a PDE2A humana. El gen de PDE2A codifica un polipéptido de 941 aminoácidos con una masa molecular prevista de 106 kD. La secuencia de proteína es un 90% idéntica a las secuencias de PDE2A bovina y de rata. El análisis de transferencia Northern mostró que el PDE2A se expresaba como un

PATRICIA KOCH MORENO
INGº [illegible]
c [illegible] 113
Telef. [illegible] - MADRID

mRNA de 4,2 kb a niveles variables en todos los tejidos humanos ensayados, con la gran excepción del cerebro. Los estudios de expresión revelaron que PDE2A hidroliza cAMP y cGMP y es inhibida por el inhibidor EHNA específico de PDE2A."

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de las PDE están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En un aspecto, la diana PDE se selecciona de una o más de las siguientes enzimas PDE: $PDE_{cAMP}$ 1, $PDE_{cAMP}$ 2, $PDE_{cAMP}$ 3, $PDE_{cAMP}$ 4, $PDE_{cAMP}$ 7 y $PDE_{cAMP}$ 8.

En un aspecto más preferido, la diana PDE se selecciona de una o más de las siguientes enzimas PDE: $PDE_{cAMP}$ 1, $PDE_{cAMP}$ 2, $PDE_{cAMP}$ 3 y $PDE_{cAMP}$ 4.

Preferiblemente, para la presente invención, la PDE para la diana es al menos PDE2.

I:PDE

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c. [illegible] n.º 113
Teléf. 510 [illegible] - MADRID

cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:PDE.

Los aspectos amplios de este aspecto de la presente invención se refieren por lo tanto a:

a) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

b) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), siendo el citado agente un I:PDE.

c) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el citado procedimiento el suministro a la hembra de un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

d) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID
Telf.

utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

e) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal còmo una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente un I:PDE.

f) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD) o para prevenir FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un I:PDE.

Otros aspectos de la presente invención comprenden:

A) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y

PATRICIA KOCH MORENO
MAN
13
ADRID
Tel.

1748

siendo el citado agente un I:PDE.

B) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, y siendo el citado agente un I:PDE.

C) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

D) Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, y siendo el

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible]
MADRID

citado agente un I:PDE.

E) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:PDE.

F) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra y siendo el citado agente un I:PDE.

G) Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de la hembra de modo que produzca un aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), y siendo el citado agente un I:PDE.

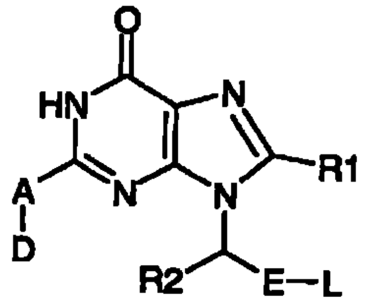
PATRICIA HOCH MORENO
...IAN
...13
...RID
Tel

Ejemplos de I:PDE se describen en los documentos EP-A-091133 y EP-A-0771799.

Preferiblemente, el I:PDE es un I:PDE2. Así, los ejemplos de compuestos preferidos son los presentados en el documento EP-A-0771799.

Por conveniencia, la reivindicación 1 del documento EP-A-0771799 se repite ahora:

Un derivado de puri-6-ona de fórmula general (I):



en la que

$R^1$ representa hidrógeno o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono,

PATRICIA ... MORENO
... MADRID

| | |
|---|---|
| $R^2$ | representa un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono opcionalmente sustituido con hidroxilo, azido o un grupo de fórmula $-NR^3R^4$ o $-OSO_2R^5$, en la que |
| $R^3$ y $R^4$ | son idénticos o diferentes y representan un cicloalquilo que contiene de 3 a 6 átomos de carbono, hidrógeno, formilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con un alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado, conteniendo respectivamente hasta 6 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $-(CO)_a-NR^6R^7$, en la que |
| a | es el número 0 o 1, |
| $R^6$ y $R^7$ | son idénticos o diferentes y representan hidrógeno, formilo, hidroxilo, fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con hidroxilo o un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, o |
| $R^3$ y/o $R^4$ | representan un alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de |

PATRICIA [illegible] MORENO

carbono, un carboxilo o un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido con hidroxilo o un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, o

$R^3$ y/o $R^4$ representan un residuo de fórmula $-(CO)_b$-T-$NR^8R^9$, -CO-$R^{10}$, -$SO_2R^{11}$ o -$SO_2NR^{12}R^{13}$, en el que

b tiene el significado dado anteriormente para a y es idéntico a éste o diferente de éste.

T puede representar un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, o cuando b no es 0, puede representar también un enlace,

$R^8$ y $R^9$ tienen el significado dado para los $R^6$ y $R^7$ anteriores y son idénticos a éstos o diferentes de éstos,

$R^{10}$ representa un heterociclo saturado, parcialmente saturado o insaturado de 5 a 7 miembros que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, que también puede estar opcionalmente sustituido en la función N con un alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de

PATRICIA ... MORENO
... MADRID
Tel.

carbono, carboxilo, benciloxicarboxilo o hidroxilo,

$R^{11}$ representa un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, bencilo o fenilo,

$R^{12}$ y $R^{13}$ son idénticos o diferentes y representan hidrógeno, fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, o

$R^{3}$ y $R^{4}$ junto con el átomo de nitrógeno forman un heterociclo saturado, parcialmente saturado o insaturado de 5 ó 6 miembros que puede contener hasta 3 heteroátomos seleccionados de N, S y/o O o un residuo -$NR^{14}$, y que está opcionalmente sustituido con carbonilo, un alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono que a su vez puede estar sustituido con hidroxilo, carboxi o un acilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contienen respectivamente hasta 6 átomos de carbono, en la que

$R^{14}$ representa hidrógeno, carbonilo o un

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

alquilo o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 5 átomos de carbono, y

$R^5$ representa fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono,

A representa una cadena alquileno o alquenileno lineal o ramificada que contiene respectivamente hasta 6 átomos de carbono,

D y L son idénticos o diferentes y representan un arilo que contiene de 6 a 10 átomos de carbono o un heterociclo aromático de 5 a 7 miembros, opcionalmente benzocondensado, que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, opcionalmente sustituido hasta 3 veces con sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre halógeno, hidroxilo, nitro, trifluorometilo, carboxi, alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 6 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $-(V)_c-NR^{15}R^{16}$ y/o $-OR^{17}$, en la que

c es el número 0 ó 1,

PATENTIA KOCH MORENO
AN
INO 13
RID

| | |
|---|---|
| V | representa un residuo de fórmula -CO o $-SO_2$, |
| $R^{15}$ y $R^{16}$ | son idénticos o diferentes y tienen el significado dado para $R^3$ y $R^4$ anteriormente, |
| $R^{17}$ | representa hidrógeno, un alquenilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono, opcionalmente sustituido hasta 3 veces con sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre hidroxilo, carbonilo o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, y/o los ciclos están opcionalmente sustituidos con un arilo que contiene de 6 a 10 átomos de carbono o con un heterociclo aromático de 5 a 7 miembros, opcionalmente condensado a benceno, que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, que está a su vez opcionalmente sustituido hasta dos veces con sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre halógeno, hidroxilo, nitro, carboxilo, trifluorometilo o un alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que |

1756
1777

PATRICIA K... MORENO
... AN
INC...
... RID
Telf. ...

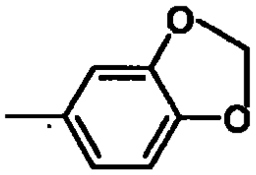
| | |
|---|---|
| | contiene respectivamente hasta 5 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $(V')_d$-$NR^{18}R^{19}$, en la que |
| d | tiene el significado dado anteriormente para a y es idéntico a éste o diferente de éste, |
| $R^{18}$ y $R^{19}$ | tienen el significado dado anteriormente para $R^3$ y $R^4$ y son idénticos a éstos o diferentes de éstos, |
| V' | tiene el significado dado anteriormente para V y es idéntico a éste o diferente de éste, y/o |
| | representa el sistema de anillo dado a continuación para D, opcionalmente sustituido con un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con hidroxilo, un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $-NR^{20}R^{21}$, en la que |
| $R^{20}$ y $R^{21}$ | son idénticos o diferentes y tienen el significado dado anteriormente para $R^3$ y $R^4$, |
| | o |
| E | representa un residuo de fórmula $-CH_2$-Y-Z, en la que |

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 13
[illegible] DRID
Tel. [illegible]

Y representa un enlace o un átomo de oxígeno o azufre o el grupo -NH-,

Z representa una cadena alquilo lineal o ramificada que contiene hasta 5 átomos de carbono,

D representa un residuo de fórmula

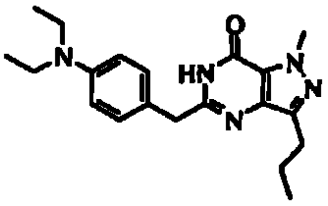
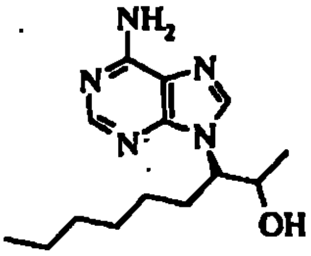
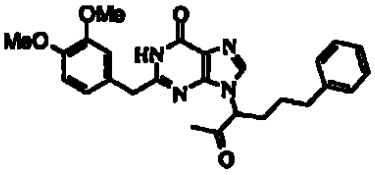
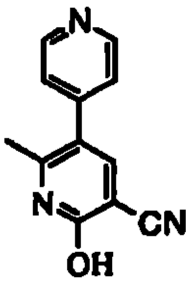


y tautómeros y sales de éste.

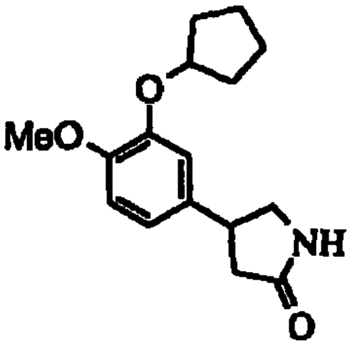
Los I:PDE preferidos se seleccionan de las siguientes estructuras:

| **Compuesto** | **Estructura** | **Modo de acción**<br>**Referencias** |
|---|---|---|

PATRICIA KOCH MORENO
ING
Tel

| | | |
|---|---|---|
| FIa |  | I:PDEI<br>EP-A-091133<br>(ejemplo 50) |
| FIb |  | I:PDE2<br>EHNA (también un inhibidor de adenosíndesaminasa) |
| FII |  | I:PDE2<br>EP-A-0771799<br>(ejemplo 100) |
| FIII |  | I:PDE3<br>Milrinona<br>(que está comercialmente disponible) |

[illegible] MORENO
AN
RID
Telf.

| | | |
|---|---|---|
| FIV |  | I:PDE4<br>Rolipram<br>(que está comercialmente disponible) |

NEP (endopeptidasa neutra)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es NEP.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de NEP están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En un aspecto, NEP es NEP (EC 3.4.24.11) (también conocida como encefalinasa o endopeptidasa-2). En este caso, se ha encontrado mRNA de NEP EC 3.4.24.11 y proteína expresada en vagina humana y de conejo.

En este caso, creemos que en las hembras, incluyendo las

PATRICIA HOCH MORENO

que sufren FSAD, se degrada el VIP por la NEP EC3.4.24.11. De esta manera, los inhibidores de NEP potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del VIP liberado durante la excitación. Esto conducirá a un tratamiento de FSAD, tal como por medio de un aumento de la congestión vaginal. Se ha mostrado que los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 estimulan los aumentos del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal y clitorídeo) estimulados por el nervio pélvico e inducidos por VIP. Además, esos inhibidores selectivos de NEP estimulan la relajación mediada por VIP y por los nervios de la pared vaginal aislada.

Las explicaciones de los antecedentes de NEP han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a NEP se ha extraído de esa fuente.

> "El antígeno de la leucemia linfocítica aguda común es un marcador de superficie celular importante en el diagnóstico de la leucemia linfocítica aguda humana (ALL). Está presente en células leucémicas de fenotipo pre-B, que representan el 85% de los casos de ALL. La CALLA no está restringido sin embargo a

PATENTES ... MORENO

las células leucémicas, y se encuentra en una serie de tejidos normales. La CALLA es una glicoproteína que es particularmente abundante en riñón, donde se presenta en el borde de cepillo de los túbulos proximales y en el epitelio glomerular. Letarte et el. (1988) clonaron un cDNA que codificaba CALLA y mostraron que la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de cDNA es idéntica a la de la endopeptidasa neutra humana asociada a membrana (NEP, EC 3.4.24.11), también conocida como encefalinasa. la NEP corta los péptidos en el extremo amino de los residuos hidrofóbicos e inactiva diversas hormonas peptídicas, incluyendo glucagón, encefalina, sustancia P, neurotensina, oxitocina y bradiquinina. Por análisis de transfección de cDNA, Shipp et al. (1989) confirmaron que CALLA es una endopeptidasa neutra funcional del tipo denominado anteriormente encefalinasa. Barker et al. (1989) demostraron que el gen CALLA, que codifica una glicoproteína transmembrana de tipo II de 100 kD, existe en una sola copia de más de 45 kD que no está reordenada como CALLA de superficie celular que expresa malignidades. Se localizó el gen en el cromosoma humano 3 por estudio de los híbridos celulares somáticos e hibridación in situ regionalizada en la

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Tel.

localización 3q21-q27. Tran-Paterson et al. (1989) asignaron también el gen al cromosoma 3 por análisis de transferencia Southern de DNA de híbridos celulares somáticos humano-roedor. D'Adamio et al. (1989) demostraron que el gen CALLA abarca más de 80 kb y está compuesto por 24 exones".

## I:NEP

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:NEP.

Los aspectos amplios de este aspecto de la presente invención por lo tanto se refieren a:

a) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

b) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), siendo el

MORENO
.AN
RID
Telf.

citado agente un I:NEP.

c) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el citado procedimiento el suministro a la hembra de un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

d) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

e) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente un I:NEP.

f) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD) o para prevenir FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento el

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] RID
Telé: [illegible]

suministro a la hembra de un I:NEP.

Otros aspectos de la presente invención comprenden:

A) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

B) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, y siendo el citado agente un I:NEP.

C) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] IAN
ING [illegible]
[illegible] ADRID
Telé. [illegible]

farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

D) Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, y siendo el citado agente un I:NEP.

E) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NEP.

F) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente capaz de estimular

PATRICIA ... MORENO
... AN
INO ... 13
... MADRID
Telf.

la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra y siendo el citado agente un I:NEP.

G) Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de la hembra de modo que produzca un aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), y siendo el citado agente un I:NEP.

Los detalles de un sistema de ensayo adecuado para identificar y/o estudiar un I:NEP se presentan en la siguiente sección.

Los I:NEP se discuten en los siguientes artículos de revisión:

Pathol. Biol., 46(3), 1998, 191.
Curent Pharm. Design, 2(5), 1996, 443.
Biochem. Soc. Trans., 21(3), 1993, 678.
Handbook Exp. Pharmacol., 104/1, 1993, 547.
TiPS, 11, 1990, 245.
Pharmacol Rev., 45(1), 1993, 87.
Curr. Opin. Inves. Drugs, 2(11), 1993, 1175.
Antihypertens. Drugs, (1997), 113.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] RID

Chemtracts, (1997), 10(11), 804.

Zinc Metalloproteases Health Dis. (1996), 105.

Cardiovasc. Drug. Rev., (1996), 14(2), 166.

Gen. Pharmacol., (1996), 27(4), 581.

Cardiovasc. Drug Rev., (1994), 12(4), 271.

Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., (1995), 22(1), 63.

Cardiovasc. Drug Rev., (1991), 9(3), 285.

Exp. Opin. Ther. Patents (1996), 6(11), 1147.

Se describen I:NEP en los siguientes documentos:

EP-509442A

US-192435

US-4929641

EP-599444B

US-884664

EP-544620A

US-798684

J. Med. Chem. 1993, 3821.

Circulation 1993, 88(4), 1.

EP-136883

JP-85136554

US-4722810

Curr. Pharm. Design, 1996, 2, 443.

EP-640594

PATRICIA ... MORENO
ING ... AN
... MADRID
Tel...

J. Med. Chem.. 1993, 36(1), 87.

EP-738711-A

JP-270957

CAS n° 115406-23-0

DE-19510566

DE-19638020

EP-830863

JP-98101565

EP-733642

WO9614293

JP-08245609

JP-96245609

WO9415908

JP05092948

WO-9309101

WO-9109840

EP-519738

EP-690070

J. Med. Chem. (1993), 36, 2420.

JP-95157459

Bioorg. Med. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65.

Los I:NEP preferidos se describen en los siguientes documentos:

PATRICIA ... MORENO
... CAN
ING ... 13
... RID
Tel. ...

EP-A-0274234

JP-88165353

Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, 164, 58

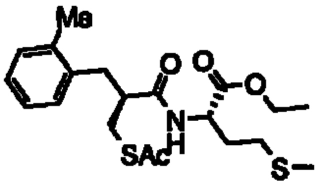
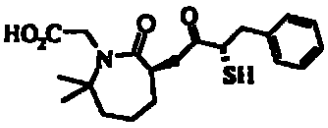
EP-629627-A

US-77978

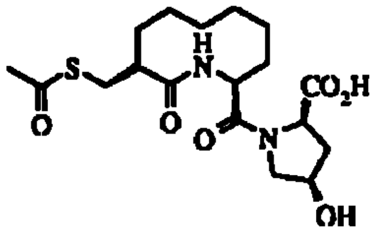
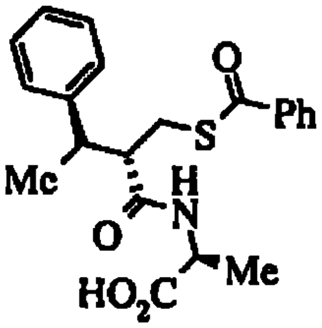
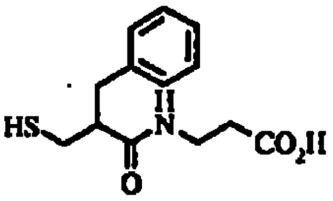
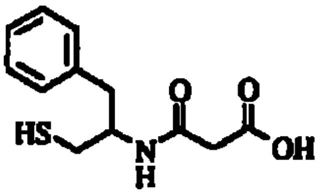
Perspect. Med. Chem. (1993), 45.

EP-358398-B

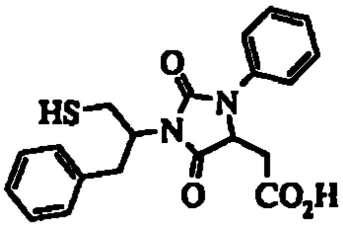
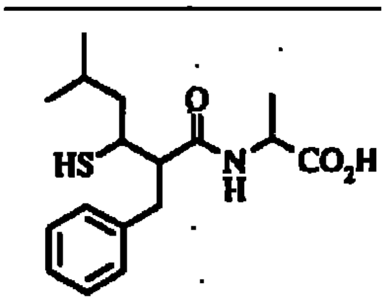
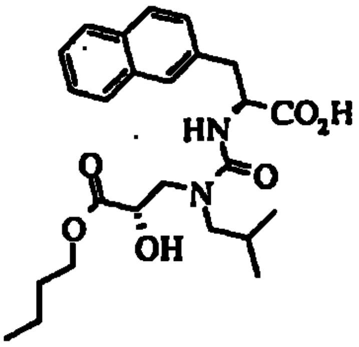
Los ejemplos preferidos de I:NEP se seleccionan de las siguientes estructuras:

| **Compuesto** | **Estructura** | **Modo de acción**<br>**Referencias** |
|---|---|---|
| FXII |  | I:NEP<br>EP-509442A<br>US-192435<br>US-4929641 |
| FXIII |  | I:NEP<br>(también inhibidor de ACE)<br>EP-599444B<br>US-884664 |

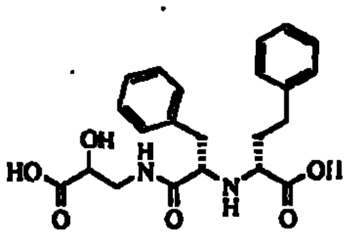
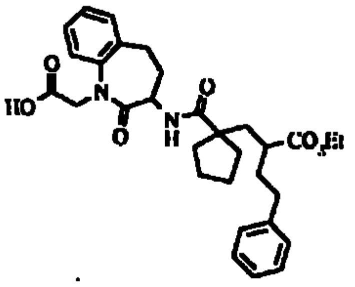
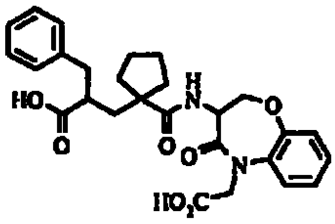
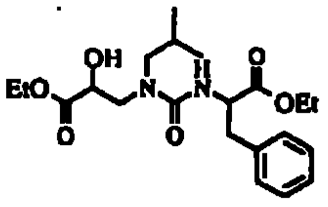
PATRICIA ... MORENO
... AN
... MADRID
Telf. ...

| | | |
|---|---|---|
| FXIV |  | I:NEP<br>EP-544620A<br>Us-798684<br>J. Med. Chem.<br>1993, 3821 |
| FXV |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>Mixanpril<br>Circulation 1993, 8(4), 1 |
| FXVI |  | I:NEP<br>EP-136883<br>JP-85136554<br>US-4722810 |
| FXVII |  | I:NEP<br>Retrothiorphan<br>Curr. Pharm. Design, 1996, 2, 443. |

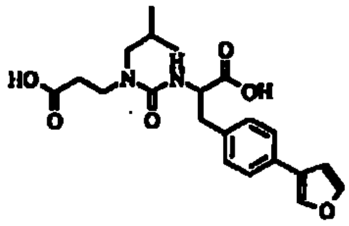
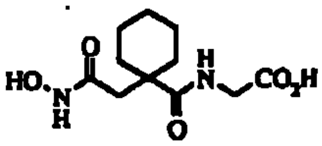
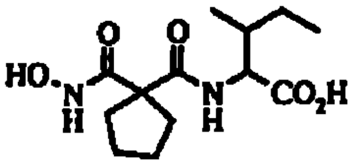
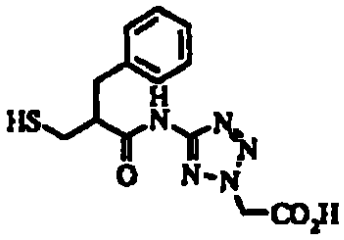
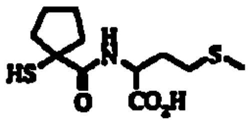
PATRICIA KECH MORENO
AN
RID
Tel

| | | |
|---|---|---|
| FXVIII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>EP-640594 |
| FXIX |  | I:NEP<br>J. Med. Chem. 1993, 36(1), 87 |
| FXX |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>EP-738711-A<br>JP-270957 |

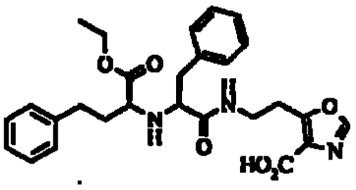
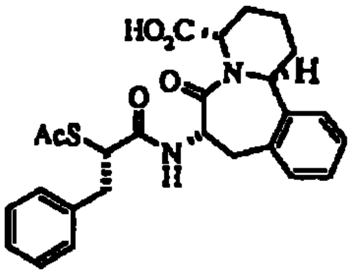
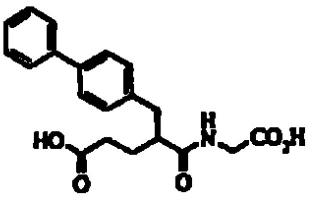
PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

| | | |
|---|---|---|
| FXXI |  | I:NEP<br>n° CAS 115406-23-0 |
| FXXII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>DE-19510566<br>DE-19638020<br>EP-830863<br>JP-98101565 |
| FXXIII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>EP-733642 |
| FXXIV |  | I:NEP<br>WO96/14293 |

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] MADRID
Telé [illegible]

| | | |
|---|---|---|
| FXXV |  | I:NEP<br>JP-08245609<br>JP-96245609 |
| FXXVI |  | I:NEP<br>WO9415908 |
| FXXVII |  | I:NEP<br>JP5092948 |
| FXXVIII |  | I:NEP<br>WO-9309101 |
| FXXIX |  | I:NEP<br>WO-9109840 |

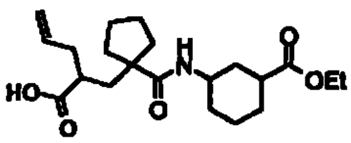
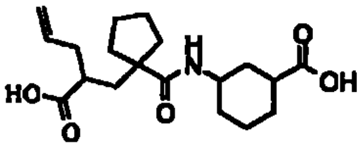
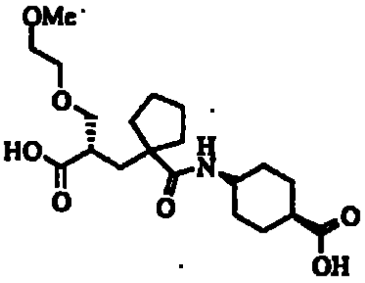
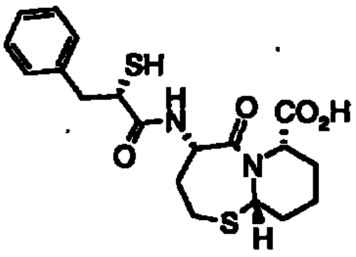
PATRICIA [illegible] MORENO
ING [illegible] MAN
[illegible] 13
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

| | | |
|---|---|---|
| FXXXI |  | I:NEP<br>EP-519738<br>EP-690070 |
| FXXXII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>J. Med. Chem. (1993), 36, 2420. |
| FXXXIII |  | I:NEP<br>JP-95157459<br>Bioorg. MEd. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65 |

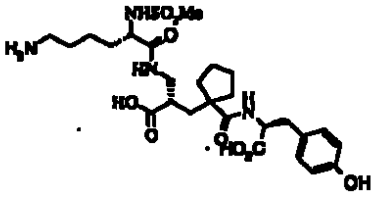
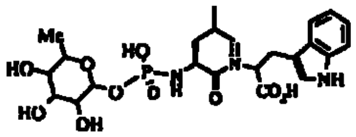
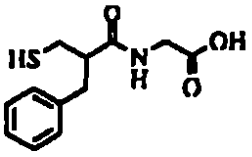
5 Los I:NEP más preferidos se seleccionan de las siguientes estructuras:

| Compuesto | Estructura | Modo de acción<br>Referencias |
|---|---|---|

PATRICIA KOCH MORENO
[illegible]
MADRID
Telé: [illegible]

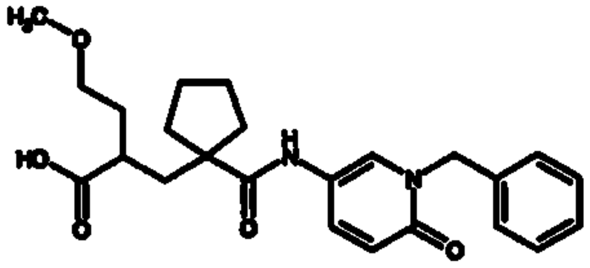
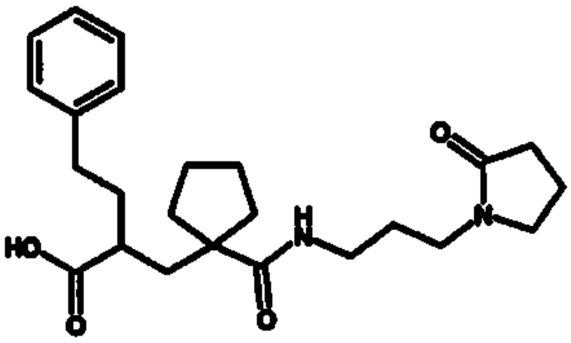
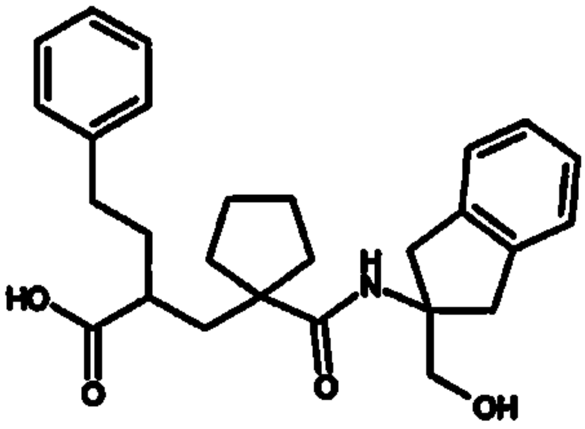
| | | |
|---|---|---|
| FV |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(ejemplo 300) |
| FVI |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(ejemplo 379) |
| FVII |  | I:NEP<br>Candoxatrilat<br>EP-274234<br>JP-88165353<br>Biochem. Biophys.<br>Res. Comm., 1989,<br>164, 58. |
| FVIII |  | I:NEP<br>Omapatrilat<br>(también un<br>inhibidor de ACE)<br>EP-0629627-A<br>US-77978 |

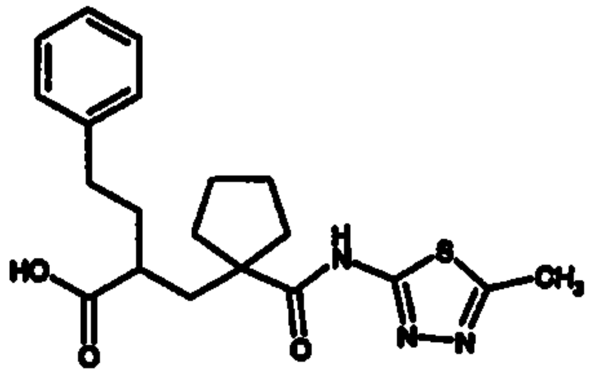
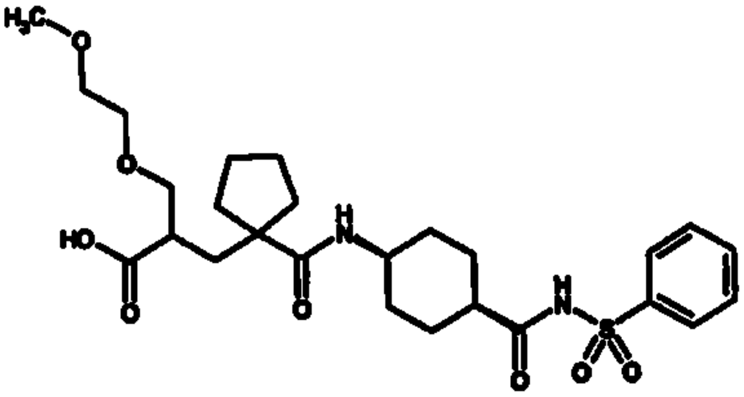
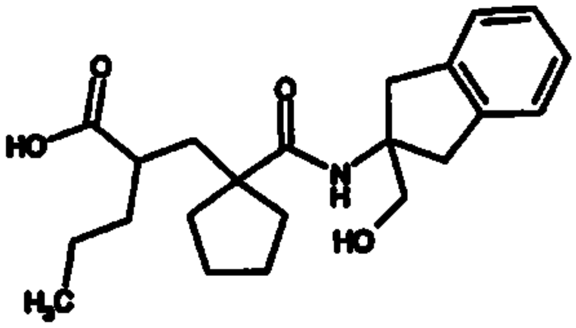
PATRICIA NEGRI MORENO

| | | |
|---|---|---|
| FIX |  | I:NEP<br>Sampatrilat<br>(también un inhibidor de ACE)<br>Perspect. Med. Chem. (1993), 45.<br>EP-0358398-B |
| FX |  | I:NEP<br>Fosforamidón<br>(que está comercialmente disponible) |
| FXI |  | I:NEP<br>Tiorfano<br>(que está comercialmente disponible) |

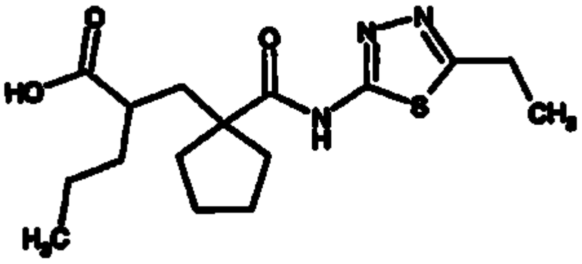
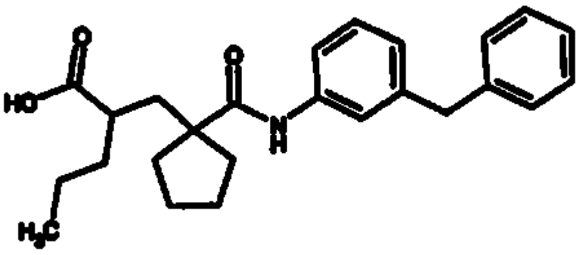
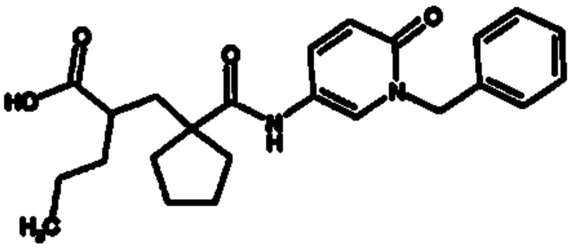
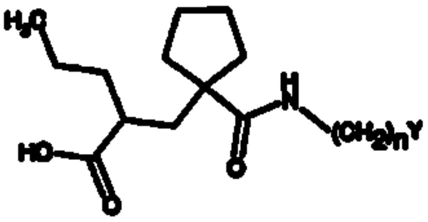
Los I:NEP más preferidos se seleccionan de las siguientes estructuras:

PATRICIA [illegible] MORENO

| COMPUESTO | ESTRUCTURA |
|---|---|
| F57 |  |
| F58 |  |
| F59 |  |

| | |
|---|---|
| **F60** |  |
| **F61** |  |
| **F62** |  |

[illegible] 17FEB00 [illegible] AY [illegible] NC [illegible] ADRID [illegible]

| | |
|---|---|
| F63 |  |
| F64 |  |
| F65 |  |
| F66 | <br>(Ic) |

PATRICIA [illegible] MORENO
INC: [illegible] AN
[illegible] 13
[illegible] MADRID
Telé [illegible]

Estos compuestos se prepararon según las explicaciones presentadas en la sección experimental (a continuación). Se ensayaron estos compuestos como agentes según la presente invención y se encontraron útiles para potenciar el cAMP, y por lo tanto útiles para el tratamiento de FSAD. Algunos de los datos experimentales referentes a estos compuestos se presentan en la sección experimental (a continuación).

## ENSAYO NEP

### PREPARACION Y ENSAYO DE ENDOPEPTIDASA NEUTRA (NEP) SOLUBLE DE CORTEZA RENAL CANINA, DE RATA, DE CONEJO Y HUMANA.

Se obtiene la NEP soluble de corteza renal y se ensaya la actividad midiendo de la tasa de ruptura del sustrato NEP Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp para generar su producto fluorescente Abz-D-Arg-Arg.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1. MATERIALES

Toda el agua se ha desionizado dos veces.

#### 1.1. Tejidos

PATRICIA KOCH MORENO

| | |
|---|---|
| Riñón humano | IIAM (Pennsylvania, EE.UU.) |
| Riñón de rata | |
| Riñón de conejo | |
| Riñón canino | |

### 1.2. Medio de homogeneización

Manitol 100 mM y Tris 20 mM a pH 7,1

2,42 g de Tris (Fisher T/P630/60) se diluyen en 1 litro de agua y se ajusta el pH a 7,1 utilizando HCl 6 M a temperatura ambiente. Se añade a ésto 18,22 g de manitol (Sigma M-9546).

### 1.3. Tampón tris (tampón NEP)

50 ml de Tris 50 mM a pH 7,4 (Sigma T2663) se diluyen en 950 ml de agua.

### 1.4. Sustrato (Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp)

Preparado por encargo en SNPE, almacenado en forma de polvo a -20°C. Se prepara una disolución madre 2 mM por resuspensión suave del sustrato en tampón Tris, éste no debe agitarse con vórtice ni sonicarse.

Se almacenan alícuotas de 600 µl de disolución madre 2 mM a -20 °C durante un periodo de hasta un mes (Medeiros, M.A.S., Franca, M.S.F. et al., (1997), Brazilian Journal

PATRICIA KOEHN MORENO
ING ... MAN
... 13
... MADRID

of Medical and Biological Research, 30, 1157-1162).

1.5. Producto total

Se incluyen en la placa muestras correspondientes a un 100% de conversión de sustrato a producto para posibilitar la determinación del % de producción del sustrato. Se genera el producto total por incubación de 1 ml de sustrato 2 mM con 20 μl de disolución madre de enzima durante 24 horas a 37°C.

1.6. Disolución de parada.

Se prepara una disolución madre 300 μM de fosforamidón (Sigma R7385) en tampón NEP y se almacena en alícuotas de 50 μl a -20°C.

1.7 Dimetilsulfóxido (DMSO)

1.8 Cloruro de magnesio, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Fisher M0600/53).

1.9 Placas de ensayo de fondo plano de 96 pocillos negras (Costar 3915).

1.10 Topseal A (Packard 6005185).

1.11. Tubos de centrífuga

2. **EQUIPAMIENTO ESPECIFICO**

2.1 Centrífuga Sorvall RC-5B (rotor SS34 GSA,

PATRICIA KOCH MORENO
...RID

preenfriada a 4°C).

2.2 mezclador Miniprimer Braun

2.3 Centrífuga Beckman CS-6R.

2.4 Fluostar galaxy

2.5 Incubador de agitación Wesbart 1589.

3. **PROCEDIMIENTOS**

3.1 PREPARACION DE TEJIDOS

3.2 Se obtienen NEP de perro, rata, conejo, y humana de corteza renal utilizando un procedimiento adaptado de Booth, A.G. & Kenny, A.J. (1974) *Biochem J.*, 142, 575-581.

3.3 Se dejan descongelar los riñones congelados a temperatura ambiente y se extraen las cortezas de la médula.

3.4 Se corta finamente en láminas la corteza y se homogeneiza en aproximadamente 10 volúmenes de tampón de homogeneización (1:2) utilizando un homogeneizador Braun (2.2).

3.5 Se añade cloruro de magnesio (1.8) (20,3 mg/g de tejido) al homogeneizado y se agita en baño de hielo durante 15 minutos.

3.6 Se centrifuga el homogeneizado a 1.500 g (3.820 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman (2.3) antes de extraer el sobrenadante a un tubo de centrífuga nuevo y descartar el sedimento.

MORENO
ING
MADRID
Tel.

3.7 Se centrifuga el sobrenadante a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Sorvall (2.1) y se descarta el sobrenadante.

3.8 Se extrae la capa rosa pálido de encima del sedimento restante y se resuspende en tampón de homogeneización que contiene cloruro de magnesio (9 mg de $MgCl_2$ en 5 ml de tampón por g de tejido).

3.9 Se centrifuga la suspensión a 2.200 g (4.630 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman (2.3) antes de descartar el sedimento.

3.10 Se centrifuga la suspensión a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos utilizando la centrífuga Sorvall (2.1) y se descarta el sobrenadante.

3.11 Se resuspende el sedimento final en tampón de homogeneización que contiene cloruro de magnesio (0,9 mg de $MgCl_2$ en 0,5 ml de tampón por g de tejido). Se obtiene una suspensión homogénea utilizando el mezclador Miniprimer Braun (2.2). Esta se congela a continuación en alícuotas de 100 $\mu$l para ensayar la actividad NEP.

## 4.0 DETERMINACION DE ACTIVIDAD NEP

Se mide la actividad de la NEP previamente dispuesta en alícuotas en función de su capacidad para cortar el sustrato peptídico específico de NEP.

4.1 Se prepara una disolución de DMSO al 4%/tampón NEP (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón NEP).

4.2 Se dejan las disoluciones madre de sustrato, producto total, enzima y fosforamidón en hielo para descongelar.

4.3 Se añaden 50 µl de disolución de DMSO al 4%/tampón NEP a cada pocillo.

4.4 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:40 para preparar una disolución 50 µM. Se añaden 100 µl de sustrato 50 µM a cada pocillo (concentración final 25 µM).

4.5 Se añaden 50 µl de un intervalo de diluciones de enzimas para iniciar la reacción (habitualmente se utilizan 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200). Se añaden 50 µl de tampón NEP a los pocillos blanco.

4.6 Se diluye el producto total 2 mM 1:80 para preparar una disolución 25 µM. Se añaden 200 µl de producto 25 µM a los cuatro primeros pocillos de una placa nueva.

4.7 Se incuban las placas a 37°C en un incubador de agitación durante 60 minutos.

4.8 Se diluye la disolución madre 300 µM de fosforamidón 1:100 a 300 nM. Se para la reacción por adición de 100 µl de fosforamidón 300 nM y se incuba a 37°C en un incubador de agitación durante 20 minutos antes de leer en un Fluostar (ex320, em420).

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] RID

## 5. ENSAYOS DE INHIBICION DE NEP

5.1 Se dejan las disoluciones madre de sustrato, producto total, enzima y fosforamidón en hielo para descongelar.

5.2 Se preparan disoluciones madre del compuesto con DMSO al 100% y se diluyen 1:25 en tampón NEP proporcionando una disolución de DMSO al 4%. Todas las demás diluciones se llevan a cabo en disolución de DMSO al 4% (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón NEP).

5.3 Se añaden 50 µl de compuesto por duplicado a la placa de 96 pocillos y se añaden 50 µl de DMSO al 4%/tampón NEP a los pocillos de control y a los pocillos blanco.

5.4 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:40 en tampón NEP preparando una disolución 50 µM (275 µl de sustrato 2 mM para 10,73 ml de tampón es suficiente para una placa).

5.5 Se diluye la disolución madre de enzima en tampón NEP (determinado por las comprobaciones de actividad).

5.6 Se diluye la disolución madre de producto total 2 mM 1:80 en tampón NEP para preparar una disolución 25 µM. Se añaden 200 µl a los primeros cuatro pocillos de una placa por separado.

5.7 Se diluye la disolución madre de fosforamidón 300 µM 1:1000 para preparar una disolución madre 300 nM (11 µl

PATENTES ... MORENO
ING. ... Y ...MAN
... nº, 113
... MADRID
Telf. ...

de fosforamidón para 10,99 ml de tampón NEP).

5.8 Se añade a cada pocillo de la placa de 96 pocillos lo siguiente:

Tabla de reactivos a añadir a la placa de 96 pocillos.

| | Compuesto /DMSO | Tampón Tris | Sustrato | Enzima NEP | Producto total |
|---|---|---|---|---|---|
| Muestras | 2 $\mu$l de compuesto | 50 $\mu$l | 100 $\mu$l | 50 $\mu$l | Nada |
| Controles | 2 $\mu$l de DMSO | 50 $\mu$l | 100 $\mu$l | 50 $\mu$l | Nada |
| Blancos | 2 $\mu$l de DMSO | 100 $\mu$l | 100 $\mu$l | Nada | Nada |
| Totales | 2 $\mu$l de DMSO | Nada | Nada | Nada | 200 $\mu$l |

5.9 Se inicia la reacción por adición de la enzima NEP antes de incubar a 37°C durante 1 hora en un incubador de agitación.

5.10 Se para la reacción con 100 $\mu$l de fosforamidón 300 nM y se incuba a 37°C durante 20 minutos en un incubador de agitación antes de leer en el Fluostar

PATRICIA NOON MORENO
ALEMAN

(ex320/em420).

## 6. CALCULOS

Se determina la actividad de la enzima NEP en presencia y en ausencia del compuesto y se expresa como un porcentaje.

% de actividad control (rendimiento de la enzima)

$$\frac{\text{FU medias de los controles - FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales - FU medias de los blancos}} \times 100$$

% de actividad con inhibidor

$$\frac{\text{FU medias del compuesto - FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales - FU medias de los blancos}} \times 100$$

Actividad expresada como % del control:

$$\frac{\text{\% actividad con inhibidor}}{\text{\% actividad del control}} \times 100$$

Se ajusta una curva de dosis-respuesta sigmoidal para el % de actividades (% de control) frente a la concentración de compuesto y se calculan los valores de CI50 utilizando

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

el ajuste de curvas LabStats en Excel.

NPY (neuropéptido Y)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es NPY o uno de sus receptores asociados.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de NPY y sus receptores están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En este caso, se ha encontrado que el neuropéptido Y (NPY) ejerce una influencia reguladora inhibidora sobre la vasorrelajación mediada por el péptido intestinal vasoactivo (VIP). De esta manera, la inhibición de los receptores de NPY dará como resultado un aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo) mediado por el VIP y el nervio pélvico. Clínicamente, esto conducirá a un aumento de la congestión vaginal y/o clitorídea que conducirá en último término a un aumento de la lubricación a través de trasudación de plasma y a un aumento de la flexibilidad vaginal. Por ello, una diana adecuada, para el tratamiento de FSAD es NPY o uno de sus receptores asociados.

PATENTIA ... MORENO
... MADRID

Así, en un aspecto preferido, el agente es un antagonista de NPY $Y_1$, $Y_2$ o $Y_5$, preferiblemente un antagonista oral de NPY $Y_1$, $Y_2$ o $Y_5$. Este agente tratará el FSAD aumentando el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal y clitorídeo) y aumentando la lubricación.

El antagonismo mediado por NPY de los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo representa, por lo tanto, una diana terapéutica potencial mediante la cual el flujo sanguíneo en el tracto genital femenino puede ser influenciado. El mecanismo a través del cual aparece este antagonismo es muy probablemente a través de activación $G_{i/o}$ inducida por el receptor de NPY $Y_1$. En otros sistemas fisiológicos, los receptores de NPY $Y_1$ han sido implicados en la mediación de la vasoconstricción y en la inhibición de la liberación de transmisores simpáticos (Lundberg et al., 1996, no puede excluirse un efecto de NPY $Y_2$). Si cree que el NPY inhibe la vasorrelajación en el tracto genital femenino mediante la inhibición directa de la adenilato ciclasa que inhibe directamente la liberación de VIP o la neurotransmisión simpática.

Como se ha indicado, un objetivo $P_{cAMP}$ es uno de los receptores de NPY.

PATRICIA ROCH MORENO
MADRID

La liberación neuronal de NPY regula la vasorrelajación inducida por VIP del lecho vascular vaginal. Esto ocurre muy probablemente a través de un mecanismo presináptico que implica a los receptores de NPY $Y_1$, aunque no puede excluirse un modo de acción post-sináptico. Un antagonista de NPY potenciará la vasodilatación inducida por VIP del lecho vascular vaginal. Clinicamente, esto conducirá a un aumento de la lubricación y de la flexibilidad vaginal a través de la congestión de la pared vaginal.

Los estudios de expresión del receptor de NPY realizados por los presentes anteriores han identificado los subtipos de receptor de NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$ dentro de la vagina humana.

Por ello, en un aspecto, la diana $P_{cAMP}$ es uno o más de los subtipos de receptores de NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$.

Las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi. nlm.nih.gov/-Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a NPY se ha extraído de esa fuente.

> "El neuropéptido Y (NPY) es un péptido abundante y ampliamente extendido en el sistema nervioso de los

PATRICIA KOCH MORENO
MAN
13
MADRID
Tel.

mamíferos. Muestra homología de secuencia con el péptido YY y por encima del 50% de homología en la secuencia de aminoácidos y en la secuencia de nucleótidos con el polipéptido pancreático (PNP, 167780). El NPY es un péptido de 36 aminoácidos. Minth et al. (1984) clonaron el gen de NPY partiendo de mRNA de feocromocitoma. Takeuchi et al. (1985, 1986) aislaron clones de cDNA de los genes NPY y PNP a partir de un feocromocitoma y un tumor endocrino pancreático, respectivamente. Utilizando estas sondas de cDNA para analizar el DNA genómico de paneles de asignación cromosómica de híbridos celulares somáticos humano-ratón, examinaron después la cuestión de si los genes son sinténicos. Los estudios no mostraron sintenia, con NPY en 7pter-7q22 y con PNP en 17p11.1-17qter. Por estudios de retrocruzamiento con Mus spretus, Bahary et al. (1991) mapearon el gen homólogo de NPY en el cromosoma 6 de ratón. Puesto que el cromosoma 6 tiene homología con el 7q humano, es probable que el gen NPY en humano esté localizado en la región 7cen-q22. Meisler et al. (1987) excluyeron ligamientos cercanos entre los loci de la fibrosis cística (219700) y el neuropéptido Y. Terenghi et al. (1987) determinaron la distribución del mRNA que codifica el NPY en

PATRICIA MEGH MOREN0
ING ... AN
... 113
c ... MADRID
Teléf. ...

neuronas de la corteza cerebral en especímenes de biopsia quirúrgica y cerebro postmortem por medio de técnicas de hibridación in situ. Mostraron una localización consistente de la transcripción y expresión del gen NPY en neuronas corticales maduras normales. Baker et al. (1995) mostró por fluorescencia de hibridación in situ que el gen NPY está localizado en 7p15.1 y que existe en una sola copia. Comentaron que el NPY es uno de los péptidos más conservados conocidos con, por ejemplo, sólo 3 aminoácidos de diferencia entre humano y tiburón. El neuropéptido Y es un neuromodulador implicado en el control del equilibrio de energía y se sobreproduce en el hipotálamo de ratones ob/ob. Para determinar el papel de NPY en la respuesta a la deficiencia de leptina (164160), Erickson et al. (1996) generaron ratones ob/ob deficientes en NPY. En ausencia de NPY, los ratones ob/ob eran menos obesos debido a una menor ingestión de alimento y la mayor gasto de energía, y estaban afectados con una menor gravedad por diabetes, esterilidad y defectos somatrópicos. Estos resultados se interpretaron como indicadores de que NPY es un efector central de la deficiencia de leptina. Los análisis de ligamiento genético de ratas que se criaron selectivamente para mostrar una

PATRICIA ... MORENO
...MADRID
Telé...

preferencia por el alcohol, identificaron una región cromosómica que incluía el gen NPY (Carr et al., 1998). Las ratas que prefieren alcohol tuvieron niveles menores de NPY en diversas regiones cerebrales comparadas con las ratas que no prefieren alcohol. Thiele et al. (1998) estudiaron por lo tanto el consumo de alcohol en ratones que carecían completamente de NPY como resultado de una alteración dirigida del gen (Erickson et al., 1996). Encontraron que los ratones deficientes en NPY mostraban un aumento del consumo, comparado con las ratones de tipo silvestre, de disoluciones que contenían etanol al 6%, 10% y 20% (en volumen). Los ratones deficientes en NPY eran también menos sensibles a los efectos sedantes/hipnóticos del etanol, como mostró una recuperación más rápida del sueño inducido por etanol, incluso aunque los niveles de etanol en plasma no diferían significativamente de los de los controles. En contraposición, los ratones transgénicos que sobreexpresaron un gen NPY marcado en neuronas que habitualmente lo expresan, tuvieron una menor preferencia por el alcohol y fueron más sensibles a los efectos sedantes/hipnóticos del etanol que los controles. Estos datos proporcionaron evidencias directas de que el consumo de alcohol y la

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

resistencia son inversamente proporcionales a los niveles de NPY en el cerebro. Como parte de un estudio en marcha sobre la base genética de la obesidad, Karvonen et al. (1998) identificaron un polimorfismo 1128T-C que resultaba de la sustitución de leucina por prolina en el residuo 7 de la parte péptido señal de pre-pro-NPY. Este polimorfismo no estaba asociado a la obesidad o al metabolismo energético, pero estaba significativa y consistentemente asociado a altos niveles de colesterol total y colesterol LDL en suero tanto en sujetos finlandeses de peso normal y obesos como en holandeses obesos. Uusitupa et al. (1998) encontró el polimorfismo pro7 en el 14% de los finlandeses, pero sólo en el 6% de los holandeses. Los sujetos con pro7 en NPY tenían, de media, niveles de colesterol total en suero de 0,6 a 1,14 mmol/l mayores que aquellos sin esta variante del gen. Puesto que el impacto de pro7 NPY sobre los niveles de colesterol en suero no pudieron encontrarse en holandeses de peso normal, puede suponerse que las personas obesas son más susceptibles al efecto de la variante del gen. Se calculó que la probabilidad de tener el pro7 en NPY podría ser del orden del 50 o del 60% en sujetos obesos con un colesterol total en suero igual o

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

superior a 8 mmol/l. Al menos entre los finlandeses, la forma pro7 de NPY es uno de los factores genéticos más potentes que afectan a los niveles de colesterol en suero. Véase también Allen y Bloom (1986), Dockray (1986), Maccarrone y Jarrott (1986), Minth et al. (1986)".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A: McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a NPYR1 se ha extraido de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY, 162640) es uno de los neuropéptidos más abundantse en el sistema nervioso mamífero y exhibe un variado intervalo de actividades fisiológicas importantes, incluyendo efectos sobre la actividad psicomotriz, ingestión de alimento, regulación de la secreción endocrina central y potentes efectos vasoactivos sobre el sistema cardiovascular. Se han definido dos grandes subtipos de NPY (Y1 e Y2) por criterios farmacólogicos. Los receptores de NPY Y1 se han identificado en una serie de tejidos, incluyendo cerebro, bazo, intestino delgado, riñón, testículos, placenta y músculo liso aórtico. El receptor Y2 se encuentra principalmente

PATRICIA ROCH MORENO

en el sistema nervioso central. Herzog et al. (1992) informaron de haber clonado un cDNA que codificaba un receptor de NPY humano del que confirmaron que era un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G. Cuando se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón embrionario humano, el receptor exhibió características de especificidad de ligando. En la línea celular de riñón, el receptor se acopló a una proteína G sensible a la toxina pertussis que mediaba la inhibición de la acumulación de AMP cíclico. En la línea celular CHO, por otro lado, el receptor no se acopló a la inhibición de la adenilato ciclasa, sino a la elevación del calcio intracelular. De esta manera, el acoplamiento de segundo mensajero del receptor de NPY era específico del tipo celular, dependiendo del repertorio específico de proteínas G y de sistemas efectores presentes en el tipo de célula. Larhammar et al. (1992) clonaron independientemente y caracterizaron el receptor de neuropéptido Y. Herzog et al. (1993) determinaron la organización molecular y la regulación del gen del receptor de NPY Y1. En contraposición con la estructura contigua de la mayoría de los genes del receptor acoplados a proteína G, encontraron que el gen del receptor de NPY Y1 tiene 3 exones. Identificaron también un polimorfismo Pstl común en el primer intrón del gen. Por hibridación in situ con fluorescencia de alta resolución, localizaron el gen en 4q31.3-q32. Herzog et al. (1997) encontraron que los genes NPY1R y NPY5R (602001) están localizados conjuntamente en el cromosoma 4q31-q32. Los dos genes se transcriben en direcciones opuestas a partir de una región promotora común. Uno de los exones 5' alternativamente ligados al gen del receptor Y1 es una parte de la secuencia de codificación del receptor Y5. Esta infrecuente reordenación sugirió a Herzog et al. (1997) que los 2 genes surgieron por un fenómeno de duplicación del gen y que pueden expresarse coordinadamente. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Lutz et al. (1997) mapearon los genes Npy1r y Npy2r en grupos de ligamiento conservado en los cromosomas 8 y 3 de ratón, respectivamente, que corresponden con la región distal del cromosoma humano 4q".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibid.). El siguiente texto referente a NPYR2 se ha extraído de esa fuente.

PATRICIA HOCH MORENO

"El neuropéptido Y (NPY) señala una familia de receptores acoplados a la proteína G presente en el cerebro y las neuronas simpáticas. Se han definido al menos 3 subtipos de receptor de neuropéptido Y sobre la base de criteria farmacológicos, distribución en tejido y estructura del gen de codificación, véanse 162641 y 162643. Rose et al. (1995) informaron de la clonación de expresión en células COS de un cDNA para el receptor tipo 2 humano, NPY2R. Las células transfectadas mostraron una alta afinidad por NPY (162640), el péptido YY (PYY, 600781) y un fragmento de NPY que incluía los aminoácidos 13 a 36. La proteína predicha de 381 aminoácidos prevista tiene 7 dominios transmembrana característicos de los receptores acoplados a la proteína G y es sólo un 31% idéntica al receptor Y1 humano (NPY1R, 162641). Se detectó un mRNA de 4 kb por transferencia Northern de muestras de tejido de diversas regiones del sistema nervioso. Gerald et al. (1995) clonaron el cDNA correspondiente al receptor Y2 de una biblioteca de expresión de cDNA de hipocampo humano utilizando un ensayo de unión de PYY marcado con radioisótopos. Expresaron el gen Y2 en células COS-7 y realizaron un ensayo de unión a hormona que mostró que el receptor Y2 se une (de mayor a menor afinidad) a las hormonas

[illegible] MORENO

1800

PYY, NPY y polipéptido pancreático (PP, 167780). Ammar et al. (1996) clonaron y caracterizaron el gen humano que codifica el receptor de NPY de tipo 2. La copia abarca 9 kb de secuencia genómica y está codificada en 2 exones. Como en el gen del receptor de NPY de tipo 1, la región no traducida de 5' de NPY2R está interrumpida por una secuencia intermedia de 4,5 kb. Ammar et al. (1996) demostraron por análisis Southern de híbridos celulares roedor-humano seguido de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) que el gen NPY2R se mapea en 4q31, la misma región que contiene el gen NPY1R, sugiriendo que estos subtipos pueden haber surgido de la duplicación del gen a pesar de sus diferencias estructurales. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Lutz et al. (1997) mapearon los genes Npy1r y Npy2r en grupos de ligamiento conservado en los cromosomas 8 y 3 de ratón, respectivamente, que corresponden a la región distal del cromosoma humano 4q".

Se presenta un ensayo para determinar si un agente supuesto o real según la presente invención puede unirse a NPY en el documento WO-A-98/52890 (véase la página 96 de éste, líneas 2 a 28).

[illegible] MORENO

I:NPY

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:NPY (a veces denominado antagonista de NPY).

Los aspectos amplios de este aspecto de la presente invención se refieren por lo tanto a:

a) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

b) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD), siendo el citado agente un I:NPY.

c) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el citado procedimiento el suministro a la hembra de un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo,

PATRICIA ... MORENO
...AN
ING ... .13
...RID
Tel...

diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

d) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

e) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente un I:NPY.

f) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD) o para prevenir FSD (preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un I:NPY.

Otros aspectos de la presente invención comprenden:

A) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de Ia FSAD, comprendiendo la

MORENO

composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

B) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, y siendo el citado agente un I:NPY.

C) Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

D) Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar

MORENO
ING
RID
Telf.

si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, y siendo el citado agente un I:NPY.

E) Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente un I:NPY.

F) El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra y siendo el citado agente un I:NPY.

G) Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID
Tele

genitales sexuales de la hembra de modo que produzca un flujo sanguíneo genital aumentado (por ejemplo vaginal o clitorídeo), y siendo el citado agente un I:NPY.

Se discuten I:NPY (en particular antagonistas de NPY) en los siguientes artículos de revisión:

Dunlop J., Rosenzweig-Lipson, S.: Therapeutic approaches to obesity, Exp. Opin. Ther. Pat. 1999, 8, 12, 1683-1694.

Wang S., Ferguson K.C., Burris T.P., Dhurandhar N.V.: 8th annual international conference on obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus: novel drug developments. Exp. Opin. Invest. Drugs 1999, 8, 7, 117-1125.

Ling A.L.: Neuropeptide Y receptor antagonists. Exp. Opin. Ther. Pat. 1999, 9, 4, 375-384. Adham N., Tamm J., Du P., Hou C., et al: Identification of residues involved in the binding of the antagonist SNAP 6608 to the Y5 receptor. Soc. Neurosci.Abstr. 1998, 24, parte 2, 626.9.

Shu Y.Z., Cutrone J.Q., Klohr S.E., Huang S.: BMS-192548, a tetracyclic binding inhibitor of neuropeptide Y receptors, from Aspergillus niger. WB2346. II. Physico-chemical properties and structural characterization. J.

PATENTES KOCH MORENO
[illegible]
MADRID
Telf. [illegible]

Antibiot. 1995, 48, 10, 1060-1065.

Rigollier P. Rueger H., Whitebread S., Yamaguchi Y., Chiesi M., Schilling W., Criscione L.: Synthesis and SAR of CGP 71683A, a potent and selective antagonist of the neuropeptide Y Y5 receptor. Int. Symp. Med. Chem., 1998, 15th Edinburgo, 239.

Criscione L., Rigollier P., Batzl-Hartmann C., Rueger H., Stricker-Krongrad A., et al: Food Intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. J. Clin. Invest. 1998, 102, 12, 2136-2145.

Neurogen Corp: NGD 95-1. Clin. Trials Monitor. 1996, 5, 10, Ab 19244.

Buttle L.A.: Anti-obesity drugs: on target for huge market sales. Exp. Opin. Invest. Drugs 1996, 5, 12, 1583-1587.

Gehlert D.R., Hipskind, P.A.: Neuropeptide Y receptor antagonists in obesity. Exp. Opin. Invest. Drugs, 1996, 7, 9, 1827-1838.

Goldstein D.J., Trautmann M.E.:.Treatments for obesity.

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID

Emerging Drugs, 1997, 2-1-27.

Hipskind P.A., Lobb K.L., Nixon J.A., Britton T.C., Bruns R.F., Catlow J., Dieckman McGinty.D.K., Gackenheimer S.L., Gitter B.D., Iyengar S., Schober D.A. et al: Potent and selective 1,2,3-trisubstituted indole NPY Y-1 antagonists. J. Med. Chem. 1997, 40, 3712-3714.

Zimmerman D.M., Cantrall B.E., Smith E.C.R., Nixon J.A., Bruns R.F., Gitter B., Hipskind P.A., Ornstein P.L., Zarrinmayeh H., Britton T.C., Schober D.A., Gehlert D.R.: Structure-activity relationships of a series of 1-substituted-4-methilbenzimidazole neuropeptide Y-1 receptor antagonists. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1998, 8, 5, 473-476.

Zarrinmayeh H., Nunes A., Ornstein P., Zimmerman D., Arnold M.B., et al.: Synthesis and evaluation of a series of novel 2-[(4-chlorophenoxy)methyl]benzimidazoles as selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. J. Med. Chem. 1998, 41, 15, 2709-2719.

Britton T.C., Spinazze P.G., Hipskind P.A., Zimmerman D.M., Zarrinmayeh, H., Schober D.A., Gehlert D.R., Bruns R.F.: Structure-activity relationships of a series of

MORENO
113
MADRID

benzotiophene-derived NPY-Y1 antagonists: optimization of the C2 side chain. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1999, 3, 475-480.

Zarrinmayeh H., Zimmerman D.M., Cantrell B.E., Schober D.A., Bruns R.F., Gakenheimer S.L., Ornstein P.L., Hipskind P.A., Britton T.C., Gehlert D.R.: Structure-activity relationship of a series of diaminoalkyl substituted benzimidazole as neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. Bioorganic, Med. Chem. Lett. 1999, 5, 647-652.

Murakami Y., Hara H., Okada T., Hashizume S., Kii, M., Ishihara, Y., Ishikawa, M., Mihara, S-I., Kato, G., Hanasaki, K., Hagishita, S., Fujimoto M.: 1,3-disubstituted benzazepines as novel, potent, selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. J. Med. Chem. 1999, 42, 14, 2621-2632.

Rudolf K., Eberlein W., Engel W., Wieland H.A., Willim K.D., Entzeroth M., Wienen W., Beck Sickinger A.G., Doods, H.N.: The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur. J. Pharmacol. 1994, 271, 2-3, R11-R13.

Wieland H.A., Willim K.D:, Entzeroth M., Wienen W., Rudolf

PATRICIA [illegible] MORENO
ING[illegible] Y [illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf [illegible]

K., Eberlein W. Engel W., Doods H.N.: Subtype selectivity and antagonist profile of the nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1995, 275, 1, 143-149.

Wright J., Bolton G., Creswell M., Downing D., Georgic L., Heffner T., Hodges J., MacKenzie R., Wise L.: 8-amino-6-(arylsulphonyl)-5-nitroquinolones: novel nonpeptide neuropetide Y1 receptor antagonists. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1996, 6, 15, 1809-1814.

Capurro D., Huidobro-Toro J.P.: The involvements of neuropeptide Y Y1 receptors in the blood pressure baroreflex: studies with BIBP 3226 and BIB 3304. Eur. J. Pharmacol. 1999, 376, 3, 251-255.

Dumont Y., Cadieux A., Doods H., Quirion R.: New tools to investigate neuropeptide Y receptors in the central and peripheral nervous systems: BIBO-3304 (Y1), BIIE-246 (Y2) y [125I]-GR-231118 (Y1/Y4). Soc. Neurosci. Abstr. 1999, 25, parte 1, Aptdo. 74.11.

Hedge S.S., Bonhaus D.W., Stanley W., Eglen R.M., Moy T.M., Loeb M., et al.: Pharmacological evaluation of 1229U91, a high affinity and selective neuropeptide Y(NPY)-Y1 receptor

ADRID

antagonist. Pharmacol. Res. 1995, 31, 190.

Matthews J.E., Chance W.T., Grizzle M.K., Heyer D., Daniels A.J.: Food intake inhibition and body weight loss in rats treated with GI 264879A, an NPY-Y1 receptor. Soc. Neurosci. Abstr. 1997, 23, parte 2, 1346.

Doods H.N., Willim K-D., Smith S.J.: BIBP 3226: a selective and highly potent NPY-Y1 antagonist. Proc. Br. Pharmacol. Soc. 1994, 13-16, Dec. C47.

Rudolf K., Eberlein, W., Engel W., Wieland H.A., Willim K.D., Entzeroth M., Wienen W., Beck Sickinger A.G., Doods H.N.: The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur. J. Pharmacol. 1994, 271, 2-3, R11-R13.

Serradelil-Le-Gal C., Valette G., Rouby P.E., Pellet A., Villanova G., Foulon L., Lespy L., Neliat G., Chambon J.P., Maffrand J.P., Le-Fur G.: SR 120107A y SR 120819A: Two potent and selective, orally-effective antagonists for NPY Y1 receptors. Soc. Neurosci. Abstr. 1994, 20, parte 1, 907, Aptdo. 376.14.

Hong Y., Gregor V., Ling A.L., Tompkins E.V., Porter J.

PATRICIA M°CH MORENO
ING. ... 113
...DRID
Telef. 51...

Chou T.S., Paderes G., Peng Z., Hagaman C., Anderes K., Luthin D., May J.: Synthesis and biological evaluation of novel guanylurea compounds as potent NPY Y1 receptor antagonist. Acs 1999, 217, Anaheim MEDI 108.

Se describen I:NPY (en particular antagonistas de NPY) en los siguientes documentos:

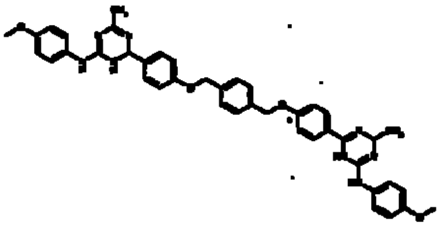
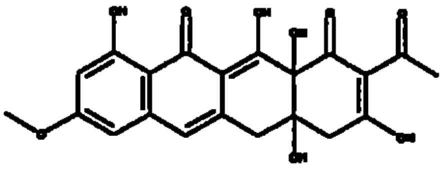
WO-98/07420
WO-94/00486
WO-96/22305
WO-97/20821
WO-97/20822
WO-96/14307
JP-07267988
WO-96/12489
US-5552422
WO-98/35957
WO-96/14307
WO-94/17035
EP-0614911
WO-98/40356
EP-0448765
EP-0747356
WO-98/35941

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

WO-97/46250

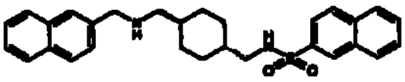
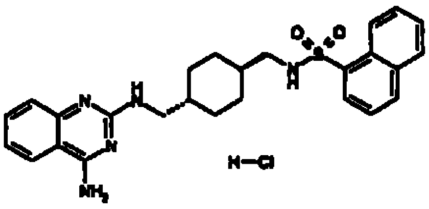
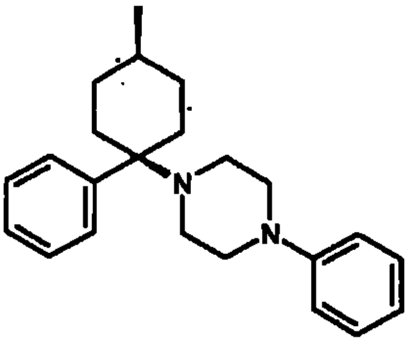
EP-0747357

Los ejemplos preferidos de I:NPY se seleccionan de las siguientes estructuras. Estos compuestos se ensayaron como agentes según la presente invención y se encontraron útiles para potenciar el cAMP, siendo por ello útiles en el tratamiento de FSAD. Algunos de los datos experimentales referentes a estos compuestos se presentan en la sección experimental (a continuación).

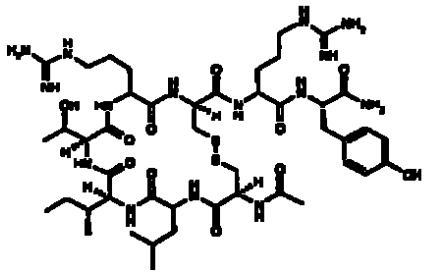
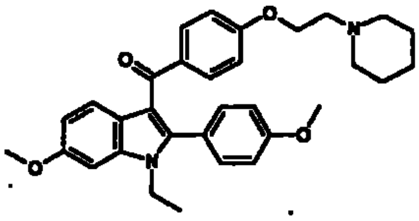
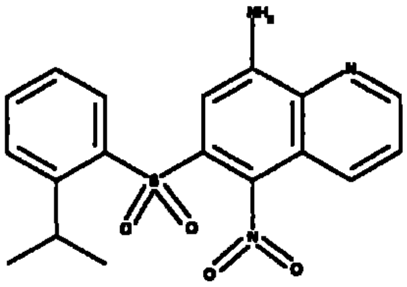
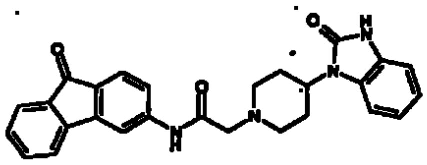
| Compuesto | Estructura | Modo de acción<br>Referencias |
|---|---|---|
| F34 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/07420<br>Ref. 3 |
| F35 |  | I:NPY<br>Ref. 5 |

PAT[illegible] MORENO
[illegible]AN
ING [illegible]
[illegible] [illegible]RID
Tele[illegible]

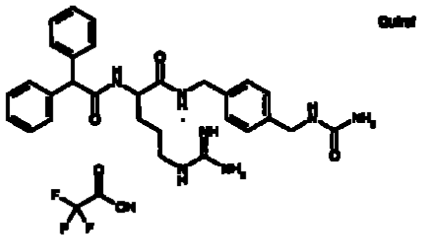
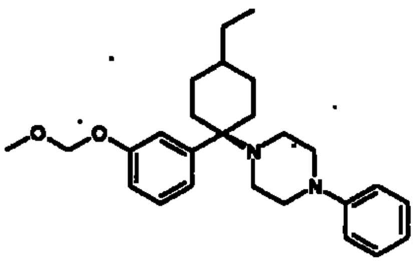
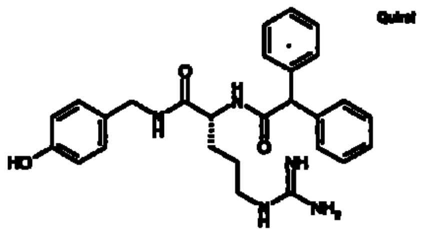
1813

| | | |
|---|---|---|
| F36 |  | I:NPY Y5<br>Ref 1,4 |
| F37 | dímero (2,2'),(4,4')-disulfuro cíclico Ile-Cys-Pro-Cys-Tyr-Arg-Leu-Arg-Tyr-NH2 | I:NPY Y1<br>WO-94/00486<br>WO-96/22305<br>Ref. 1, 2, 23 |
| F38 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/20821<br>WO-97/20822<br>Ref. 1, 3, 6, 7 |
| F39 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref. 1, 8, 9, 10, 11 |

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 115
[illegible] ADRID
Tel. [illegible]

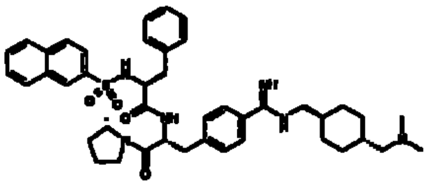
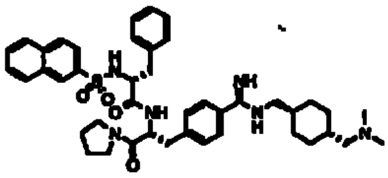
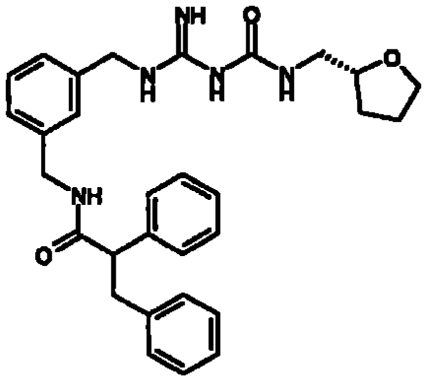
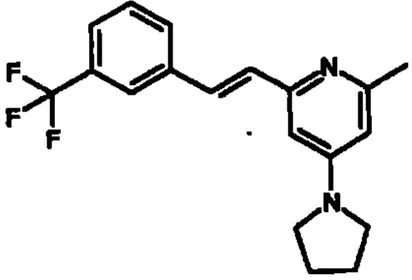
| | | |
|---|---|---|
| F40 |  | I:NPY Y1<br>JP-07267988<br>Ref. 1 |
| F41 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/12489<br>Ref. 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |
| F42 |  | I:NPY Y1<br>US-5552422<br>Ref. 17, 18, 19, 20 |
| F43 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/35957<br>Ref. 3 |

PATRICIA KLEIN MORENO
MADRID
Telf.

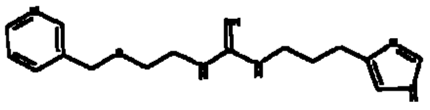
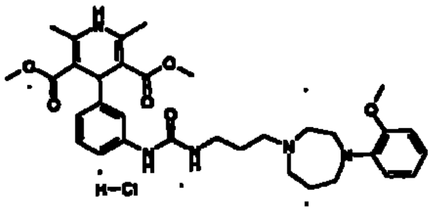
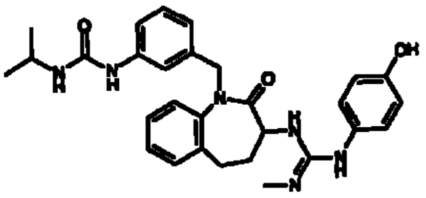
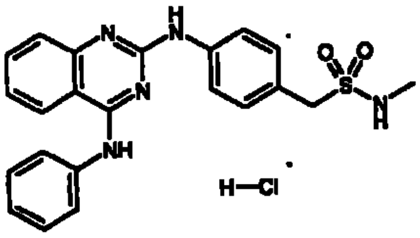
| | | |
|---|---|---|
| F44 |  | I:NPY Y1<br>Ref. 21, 22 |
| F45 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref. 3 |
| F46 | Para la fórmula véase la referencia | I:NPY Y1<br>Ref. 24 |
| F47a |  | I:NPY Y1<br>WO-94/17035<br>Ref. 3, 17, 15, 26 |
| F47b | Para la fórmula véase la referencia | I:NPY Y1<br>Ref. 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |

PATRICIA ... MORENO
... AN
... 113
... MADRID
Telé. ...

1816 ~~1817~~

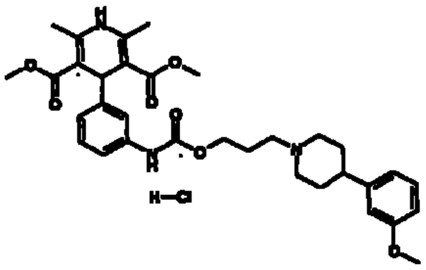
| | | |
|---|---|---|
| F48 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref. 27 |
| F49 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27. |
| F50 |  | I:NPY Y1<br>Ref. 28 |
| F51 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/40356 |

MORENO

| | | |
|---|---|---|
| F52 |  | I:NPY<br>EP-0448765 |
| F53 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747356 |
| F54 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/35941 |
| F55 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/46250 |

PATRICIA [illegible] MORENO [illegible] RID

1818

| | | |
|---|---|---|
| F56 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747357 |

VIP (péptido intestinal vasoactivo)

Según un aspecto de la presente invención, una diana de $P_{cAMP}$ es VIP o uno de sus receptores asociados. La clasificación/nomenclatura actual se refiere a estos como VPAC1, VPAC2 y PACAP.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos para VIP y sus receptores están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

Hemos mostrado que VPAC1 y VPAC2 están presentes en la vagina humana y en la de conejo. PACAP estaba ausente tanto en la vagina de conejo como en la humana.

VIP es un importante neurotransmisor endógeno liberado

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ... MAN
... :13
... MADRID
Telf. ...

durante la excitación sexual que es responsable de la vasodilatación vaginal inducida por el nervio del lecho vascular localizado en la pared vaginal. Estos efectos vasodilatadores están mediados por la activación de adenilato ciclasa y la producción de cAMP. Sin pretender limitarse a la teoría, este efecto puede estar mediado a través de receptores de VIP subtipos $VPAC_1$, $VPAC_2$ o PACAP (péptido activador de la adenilato ciclasa en la pituitaria). Los receptores $VPAC_2$ y PACAP son los más ampliamente extendidos en el SNC y estos receptores, a pesar de expresarse en la pituitaria, parecen no tener una función biológica extendida.

El agente de la presente invención podría potenciar el VIP y/o actuar como un mimético o análogo de éste. El agente potenciaría entonces y/o imitaría los efectos vasorrelajantes del VIP endógeno liberado durante la excitación sexual. El agente puede tener también un efecto aditivo sobre la relajación del músculo liso vaginal inducida por VIP. Clínicamente, esto conducirá al tratamiento de FSAD mediante el aumento de la lubricación vaginal a través de la congestión y flexibilidad de la pared vaginal. En esta realización, el mimético o análogo no tendría, sin embargo, las propiedades adversas de VIP como se han discutido anteriormente.

PATRICIA KOCH MORENO
ING. [illegible]
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

Las explicaciones de los antecedentes sobre VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/-searchomim.htm. La siguiente información referente al VIP se ha extraído de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP), un péptido de 28 aminoácios aislado originalmente de duodeno porcino, está presente no sólo en tejidos gastrointestinales sino también en tejidos neuronales, posiblemente como neurotransmisor, y exhibe una amplia variedad de acciones biológicas. Debido a que el VIP muestra similitudes con el glucagón, la secretina y el péptido inhibitorio gástrico (GIP), se ha considerado un miembro de la familia de glucagón-secretina. El producto primario de traducción del mRNA que codifica el VIP (prepro-VIP) tiene un peso molecular de 20 dalton. Por clonación de la secuencia de DNA complementaria al mRNA que codifica el VIP humano, Itoh et al. (1983) encontraron que el precursor de VIP contiene no sólo el VIP sino también un nuevo péptido de 27 aminoácidos, designado como PHM27, que tiene histidina aminoterminal y metionina carboxiterminal. Difiere del PHI17 aislado de intestino porcino en 2

PATRICIA KOSH MORENO
IAN
MADRID
Teléf.

aminoácidos, el PHI27, como su designación indica, tiene isoleucina carboxiterminal. Linder et al. (1987) aislaron el gen humano de VIP y PHM27 y estudiaron su expresión en diversos tejidos de rata. Heinz-Erian et al. (1985) sugirieron que la deficiente innovación de las glandulas sudoríparas de los pacientes con fibrosis quística por el neuropéptido VIP podría ser un mecanismo básico de reducción del contenido de agua y de impermeabilidad relativa del epitelio al cloruro y a otros iones que caracteriza a la fibrosis quística. Para comprobar esta hipótesis, Gozes et al. (1987) adoptaron el enfoque de "gen candidato". Bodner et al. (1985) habían mostrado que el VIP y el PHM-27 están codificados por exones adyacentes. Gozes et al. (1985) utilizaron el fragmento genómico de codificación de PHM-27 para detectar la presencia del gen VIP en 6q21-qter. De esta manera, eliminaron un gen deficaz de VIP como candidato a causa primaria de fibrosis quística (que está codificada en el cromosoma 7). Por técnicas de hibridación in situ, Gozes et al. (1987) asignaron el gen VIP a 6q24. Esto colocó a VIP en la región de MYB (189990), que se ha mapeado en 6q22. Gozes et al. (1987) investigaron una relación funcional entre los 2 genes en tejido

[illegible]

neuronal. Observaron un pico agudo de mRNA de MYB en el hipocampo de ratas de 3 días de edad, antes del pico de mRNA de VIP que aparece en este área a los 8 días de edad. Omary y Kagnoff (1987) encontraron receptores nucleares para el VIP en una línea celular de adenocarcinoma colónico humano. Gotoh et al. (1988) asignaron el VIP al cromosoma 6 por hibridación de transferencia de manchas de un fragmento clonado molecularmente del gen a cromosomas clasificados. La localización se refinó a 6q26-q27 por hibridación in situ".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre el VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a VIPR1 o VPAC1 se ha extraido de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP, 192320) es un mediador neuroendocrino octacosamérico encontrado principalmente en neuronas presinápticas colinérgicas del sistema nervioso central y en neuronas peptidérgicas periféricas que inervan diversos tejidos. De los muchos pétidos neuroendocrinos con funciones inmunológicas, el VIP se distingue por su capacidad de afectar tanto a células B como a células

PATRICIA NASH MORENO
13
MADRID

T directamente. Los distintos subconjuntos de células neuronales, respiratorias, gastrointestinales e inmunes llevan receptores de alta afinidad específicos de VIP, que están asociados con una proteína de unión al nucleótido guanina (G) capaz de activar la adenilato ciclasa. Libert et al., (1991) obtuvieron 4 nuevos receptores de la familia de receptores acoplados a la proteína G por amplificación selectiva y clonación de cDNA tiroide. Uno de ellos, RDC1, fue identificado como el receptor de VIP por Sreedharan et al (1991). Libert et al. (1991) mapearon el gen VIPR en 2q37 por hibridación in situ. Informaciones posteriores hicieron dudoso que el gen mapeado en 2q37 fuera de hecho el gen del receptor de VIP (Vassart, 1992). La secuencia que designó como GPRN1 Sreedharan et al. (1991) y que se mapeó en 2q37 se encontró que no se unía a VIP según Wenger (1993). Sreedharan et al. (1995) aislaron un gen del receptor de VIP de tipo I auténtico y lo localizaron por hibridación in situ con fluorescencia en la banda de 3p22 en una región asociada al cáncer de pulmón de células pequeñas. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Hashimoto et al. (1999) mapearon el gen Vipr1 de ratón en la región distal del cromosoma 9, una región que muestra

MORENO
AN
113
MADRID

1824

homología de sintenia con el cromosoma humano 3p. Sreedharan et al. (1993) clonaron un gen del receptor de VIP intestinal humano, la secuencia de aminoácidos deducida comparte el 84% de identidad con el receptor de VIP de pulmón de rata. Couvineau et al. (1994) aislaron 2 clones de cDNA de VIPR a partir de una biblioteca de cDNA de célula epitelial de yeyuno humano. Uno codifica un receptor de VIP que consiste en 460 aminoácidos y que tiene 7 dominios transmembrana putativos, así como otros receptores acoplados a la proteína G. El otro codifica una proteína relacionada con el receptor de VIP de 495 aminoácidos que exhibe un 100% de homología con el receptor de VIP funcional a lo largo de 428 aminoácidos y en la región C-terminal, pero que contiene un dominio N-terminal completamente divergente de 67 aminoácidos. Cuando se expresa en células COS-7, la segunda proteína no se une a VIP radioyodado, aunque se dirigió normalmente a la membrana plasmática como se evaluó por estudios de inmunofluorescencia. Sreedharan et al. (1995) encontraron que el receptor de VIP de tipo I, también denominado receptor PACAP de tipo II (véase 102981 para otro tipo de receptor PACAP), abarcaba aproximadamente 22 kb y comprendía 13 exones (entre

MORENO
MADRID

42 y 1.400 pb) y 12 intrones (entre 0,3 y 6,1 kb). Sreedharan et al. (1995) caracterizaron también le promotor y la región adyacente del extremo 5' del gen".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre el VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a VIPR2 o VPAC2 se ha extraido de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP, 192320) y el polipéptido activante de la adenilato ciclasa en pituitaria (PACAP, 102980) son péptidos homólogos que funcionan como neurotransmisores y como hormonas neuroendocrinas. Aunque los receptores de VIP y PACAP comparten homología, difieren en sus especificidades de sustrato y en sus patrones de expresión. Veáse VPR1 (192321) y ADCYAP1R1 (102981). Svoboda et al. (1994) realizaron una PCR de bajo rigor utilizando cebadores basados en secuencias conservadas entre los receptores de VIP. Clonaron el gen del receptor de VIP2 humano de una biblioteca de cDNA de linfoblasto. Este gen codificaba un polipéptido de 438 aminoácidos que comparte el 86% de identidad con el receptor de VIP2 de rata. Expresaron el receptor de VIP2 humano

MORENO
AN
RID

en células de ovario de hámster chino y encontraron que se une a PACAP-38, PACAP-27, VIP y helodermina, y esa unión del receptor a cualquiera de estos péptidos activa la adenilato ciclasa. Se encontró que la unión de los péptidos estaba inhibida por GTP. Adamou et al. (1995) clonaron el gen del receptor de VIP2 de una biblioteca de cDNA de placenta humana. La transferencia Northern reveló que VIPR2 se expresaba como 2 transcriptos de 4,6 kb y 2,3 kb a altos niveles en el músculo esquelético y a niveles menores en corazón, cerebro, placenta y páncreas. Mackay et al. (1996) utilizaron hibridación in situ con fluorescencia para mapear el gen VIPR2. Posteriores mapeados con líneas celulares derivadas de pacientes con holoprosencefalia tipo 3 (HPE 3, 142945) revelaron que el gen VIPR2 se encuentra en la región crítica mínima HPE3. MacKay et al (1996) afirmaron que aunque VIPR2 puede contribuir al fenotipo de HPE3, no es el único factor responsable".

AC (adenilato ciclasa)

Según un aspecto de la presente invención, una diana $P_{cAMP}$ es la AC.

MORENO
MAN
13
MADRID
Tel.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de AC están disponibles en la bibliografía.

Para confirmar que el VIP induce la vasorrelajación a través de la elevación de los niveles de cAMP intracelular y la consiguiente activación de la adenilato ciclasa, se han medido las concentraciones de cAMP vaginal durante la estimulación con VIP y se ha utilizado forscolina, un activador de la adenilato ciclasa, para imitar los efectos de activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa.

En estos estudios, se encuentra que el tratamiento con VIP y forscolina eleva las concentraciones intracelulares de cAMP en tejido vaginal aislado.

También se encuentra que la forscolina aumenta el flujo sanguíneo vaginal en un modelo animal de excitación sexual.

Además encontramos que la forscolina induce la relajación en la vagina aislada.

Las explicaciones de los antecedentes sobre la AC y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/-searchomim.htm. La siguiente información referente a la AC

MORENO
AN
113
MADRID

se ha extraído de esa fuente.

"La adenilato ciclasa (EC 4.6.1.1) cataliza la transformación de ATP en AMP cíclico. La actividad enzimática está bajo el control de varias hormonas, y diferentes polipéptidos participan en la transducción de la señal del receptor al resto catalítico. Los receptores estimuladores o inhibidores (Rs y Ri) interactúan con las proteínas G (Gs y Gi) que exhiben actividad GTPasa y modulan la actividad de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. Parma et al. (1991) clonaron un cDNA correspondiente a adenililciclasa de cerebro humana, simbolizada por ellos como HBAC1. Por hibridación in situ a extensiones cromosómicas en metafase utilizando la sonda de cDNA de cerebro humano, Stengel et al. (1992) mostraron que el gen está localizado en 8q24.2. Se asignó un gen altamente homólogo, ADCY2 (103071) a 5p15.3 mediante el mismo procedimiento".

## TECNICAS DE METODOLOGIA GENERAL DE DNA RECOMBINANTE

Aunque en general las técnicas mencionadas en la presente son bien conocidas en la técnica, puede hacerse referencia

MORENO
AN
RID

en particular a Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) y a Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999), 4ª edición, John Wiley & Sons, Inc. Se describe la PCR en los documentos US-A-4683195, US-A-4800195 y US-A-4965188.

SUMARIO

En resumen, la presente invención se refiere a:

1. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, en particular del FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, en particular del FSAD.

[illegible] MORENO
[illegible]AN
[illegible]RID

1830

3. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a:

5. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular

... MORENO
... AN
... 113
... ADRID
TEL...

del FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP
I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_{n}$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_{n}$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_{n}$
P$_{cAMP}$.

6. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, siendo el agente capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular del FSAD, estando el agente seleccionado de uno o más de:

[illegible] MORENO
[illegible] 13
[illegible] RID

un mimético de cAMP

I:$PDE_{cAMP}$

I:$PDEn_{cAMP}$

I:NPY

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

$P_{cAMP}$.

7. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de tratar a una hembra que sufre FSD, en particular del FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y estando el agente seleccionado de uno o más de:

un mimético de cAMP

I:$PDE_{cAMP}$

PAT[illegible] ROMERO
[illegible] AN
[illegible] ADRID
Tel. [illegible]

1833

I:PDEn$_{cAMP}$

I:NPY

I:NPY Y$_n$

I:NEP

U:A$_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:VIP$_n$

I:I:VIPr

I:I:VIP$_n$

P$_{cAMP}$.

8. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede tratar a una hembra que sufre FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo la determinación de si un agente putativo es capaz o no de actuar como uno o más de:

un mimético de cAMP

I:PDE$_{cAMP}$

I:PDEn$_{cAMP}$

I:NPY

I:NPY Y$_n$

I:NEP

U:A$_{cAMP}$

PATRICIA ... MORENO
... AM
... 113
... MADRID
Telé...

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

$P_{cAMP}$.

en el que si el agente putativo es capaz de actuar como uno o más de

un mimético de cAMP

I:$PDE_{cAMP}$

I:$PDEn_{cAMP}$

I:NPY

I:NPY $Y_n$

I:NEP

U:$A_{cAMP}$

A:AC

A:VIPr

A:$VIP_n$

I:I:VIPr

I:I:$VIP_n$

$P_{cAMP}$.

entonces el agente puede ser útil en el tratamiento de la

[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

FSD, en particular del FSAD.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a:

9. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de estimlar la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), siendo el agente capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra.

11. Un procedimiento de tratamiento de una hembra, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de estimular la señalización de cAMP en los genitales sexuales de una hembra de modo que

[illegible] 113 [illegible] ADRID
Telf. [illegible]

produzca un aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo).

**EJEMPLOS**

La presente invención se describirá a continuación, sólo como ejemplos, en los que se hace referencia a las siguientes Figuras:

La Figura 1 que es un gráfico,
La Figura 2 que es un gráfico,
La Figura 3 que es un gráfico,
La Figura 4 que es un gráfico,
La Figura 5 que es un gráfico,
La Figura 6 que es un gráfico,
La Figura 7 que es un gráfico,
La Figura 8 que es un gráfico,
La Figura 9 que es un gráfico,
La Figura 10 que es un gráfico,
La Figura 11 que es un gráfico, y
La Figura 12 que es un gráfico.

**Más detalladamente:**

Figura 1. Estimulación eléctrica del nervio pélvico que

MORENO
MAN
13
MADRID
Telf.

induce un aumento dependiente de la frecuencia del flujo sanguíneo vaginal en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Al aumentar la frecuencia de estimulación se inducen mayores aumentos del flujo sanguíneo. Se monitorizaron los cambios utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 2. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. La Figura 2A ilustra cómo aumenta el flujo sanguíneo vaginal de manera dependiente de la concentración por infusiones de VIP (bolo intravenoso). La Figura 2b demuestra que 2 infusiones repetidas de VIP producen aumentos similares del flujo sanguíneo. Obsérvese que la duración de la respuesta es también similar. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 3. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) reduce la presión sanguínea arterial media en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Este gráfico ilustra los efectos típicos de los agentes vasoactivos, y los parámetros de estimulación utilizados para investigar el flujo sanguíneo en la vagina, respecto a la presión arterial media en un conejo anestesiado. Estos efectos

PRENO
MAN
113
MADRID
Teléf.

observados son típicos de las tendencias vistas en todos los animales ensayados. El VIP indujo una depresión significativa de la presión arterial media, mientras la estimulación del nervio pélvico, no teniendo efecto las infusiones de control de suero salino heparinizado o de inhibidores de $PDE_{cAMP}$ o NEP sobre la presión sanguínea. Obsérvese que la reducción de la presión sanguínea asociada con las infusiones de VIP está también asociada a un gran aumento del ritmo cardiaco.

Figura 4. La activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa imita la vasorrelajación mediada por VIP y la relajación de músculo liso en tejido vaginal. La Figura 4a ilustra que una infusión de forscolina (un mimético de cAMP, 40 nmol/kg/bolo intravenoso) induce aumentos significativos del flujo sanguíneo vaginal. Obsérvese que la amplitud y duración de la respuesta es similar a la inducida por el VIP (20,0 µg/kg bolo intravenoso). Resulta interesante que los efectos sobre el flujo sanguíneo tienen una duración mayor de acción sobre la pared vaginal externa. Todos los cambios se monitorizaron utiliziando tecnologías de láser Doppler. La Figura 4b demuestra que tanto el VIP (0,1 µM) como la forscolina (10 µM) elevan significativamente las concentraciones intracelulares de cAMP por encima de los niveles basales en vagina de conejo.

[illegible] MADRID

La Figura 4c muestra que la forscolina induce potentes relajaciones en bandas vaginales de conejo precontraídas (1 μM de fenilefrina) con un CI de aproximadamente 300 nM. Se cuantificaron todos los cambios utilizando tecnologías de láser Doppler in vivo, de enzimoinmunoensayo de cAMP bioquímico o de relajación de tejidos in vitro.

Figura 5. La infusión de VIP aumenta el flujo sanguíneo clitorídeo y la activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa imita la vasorrelajación clitorídea mediada por VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. La infusión de VIP (60-200 μg/kg) induce un aumento dependiente de la concentración del flujo sanguíneo clitorídeo. Se observó un aumento del 115% del flujo sanguíneo clitorídeo después de una infusión intravenosa de 200 μg/kg de VIP. Los efectos de VIP sobre el flujo sanguíneo clitorídeo pueden imitarse por una infusión del mimético de cAMP, forscolina (FSK, 40 nmol/kg bolo intravenoso). Se observó un aumento del 156% del flujo sanguíneo clitorídeo después de una infusión intravenosa de 40 nmol/kg de forscolina. Todos los aumentos fueron significativamente elevados respecto de las infusiones control (suero salino heparinizado). Obsérvese que la amplitud de la respuesta es similar a la inducida por VIP (200 μg/kg, bolo intravenoso) y comparable a las observadas

[illegible] 113 [illegible] MADRID

1840

en el flujo sanguíneo vaginal de las figuras 2 y 4. Se cuantificaron todos los cambios por tecnologías de láser Doppler in vivo y eran significativamente superiores comparados con las infusiones de vehículo (suero salino heparinizado).

Figura 6. Un inhibidor selectivo de NEP EC 3.4.24.11 estimula el aumento del flujo sanguíneo vaginal por estimulación del nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. PNS repetidas con intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (barra blanca). La administración de un inhibidor de NEP (barra gris) estimula el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4Hz), comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control o los controles de vehículo coincidentes en el tiempo (barra rayada). Se observaron los siguientes aumentos dependientes de la dosis: 0,3 mg/kg, iv, indujo un aumento del 40% y 1,0 mg/kg, iv, indujo un aumento del 91% (n media = 3). El inhibidor de NEP no tuvo efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (no estimulado) (datos no mostrados). Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

MORENO
AN
13
MADRID

Figura 7. Los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 estimulan los aumentos de flujo sanguíneo vaginal inducidos por VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las infusiones de VIP repetidas en intervalos de 30 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b). El inhibidor de NEP potencia la amplitud y prolonga la duración del flujo sanguíneo estimulado cuando estos aumentos estan inducidos por dosis submáximas de VIP, por ejemplo 6,0 µg/kg. A dosis de VIP que inducen aumentos máximos del flujo sanguíneo vaginal, por ejemplo 60 µg/kg, los inhibidore de NEP potencian sólo la duración del flujo sanguíneo vaginal. Se muestran los aumentos inducidos por VIP en presencia de un inhibidor de NEP como triángulos negros, mostrándose las respuestas de control VIP como triángulos blancos. La infusión de control de suero salino heparinizado no tiene efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando técnologías de láser Doppler.

Figura 8. Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal estimulados por el nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las PNS repetidas en intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles

MORENO
AN
113
MADRID

del flujo sanguíneo vaginal (cuadrados blancos). La administración del inhibidor de $PDE_{cAMP}$ tipo 2 estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (cuadrados negros, a 4Hz) comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control coincidente en el tiempo (cuadrados blancos). Una infusión del inhibidor PDE2 (500 µg/kg) indujo una estimulación de 86,8 ± 21,9% del flujo sanguíneo vaginal (media ± s.e.m. error típico de la media), n= 2). Todos los cambios se monitorizaron utilizando técnologías de láser Doppler.

Figura 9: Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal inducidos por VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las infusiones de VIP repetidas en intervalos de 30 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b). Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 (25 µg/kg, bolo intravenoso) potencia la duración del flujo sanguíneo vaginal estimulado inducido por VIP (60 µg/kg, bolo intravenoso). Los aumentos inducidos por VIP en presencia de un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ se muestran como triángulos negros, mientras que las respuestas control de VIP se muestran como triángulos blancos. La infusión control de suero salino heparinizado

no tuvo efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 10. Un antagonista selectivo de los receptores de NPY Y1 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal estimulados por el nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las PNS repetidas en intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (datos no mostrados). La administración de un antagonista de NPY Y1 (barra gris) estimula el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4Hz), comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control o los controles de vehículo coincidentes en el tiempo (barra rayada). Se observaron los siguientes aumentos dependientes de la dosis: 0,01 mg/kg, iv, indujo un aumento del 15,8 ± 19,6%, 0,03 mg/kg, iv, indujo un aumento del 35,1 ± 17,17%, 0,10 mg/kg indujo un aumento del 60,1 ± 16,9% y 0,3 mg/kg indujo un aumento del 91,1 ± 27,4% (media ± s.e.m. n = 3). El antagonista de NPY Y1 no tuvo efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (no estimulado) (datos no mostrados). Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

La Figura 11 proporciona un gráfico resumen para algunos de los datos proporcionados en la presente, que muestra que los agentes de la presente invención son muy útiles para aumentar el flujo sanguíneo vaginal por potenciación de los niveles de cAMP endógeno.

Figura 12. Un inhibidor selectivo de NEP EC 3.4.24.11 estimula los aumentos de flujo sanguíneo clitorídeo estimulados por el nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. La administración de un inhibidor de NEP (barra gris) estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo clitorídeo inducido por frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4Hz), comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control o los controles de vehículo coincidentes en el tiempo (barra rayada). Se observaron los siguientes aumentos dependientes de la dosis: aproximadamente 1,0 mg/kg, iv, indujo un aumento del 131% (media n = 3). El inhibidor NEP no tuvo efecto sobre el flujo sanguíneo clitorídeo basal (no estimulado). Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

MORENO
[illegible] 113
MADRID
Teléf. [illegible]

## UN ENSAYO PARA MEDIR LAS ACTIVIDADES/NIVELES DE cAMP

Medida de cAMP en muestras de tejidos vaginales utilizando un estuche de enzimoinmunoensayo (EIA) para cAMP de Biotrak (Amersham Life Sciences RPN 225).

Los niveles de cAMP se miden por EIA en muestras de tejido vaginal. El EIA se basa en la competición entre cAMP sin marcar y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa para una cantidad limitada de anticuerpo específico de cAMP.

### 1. MATERIALES

Todos los materiales son suministrados por el estuche EIA para cAMP de Amersham Life Sciences (RPN 225), a menos que se indique otra cosa.

1.1 Placa de microvaloración. Placa de 96 pocillos recubierta con IgG de asno anti-conejo.

1.2 Tampón de ensayo. Tampón acetato de sodio 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Los contenidos del frasco se transfieren a una probeta utilizando lavados de agua destilada, 3 x 15 ml. El volumen final se ajusta entonces

MADRID

a 500 ml.

1.3 Patrón de cAMP (para el procedimiento de acetilación). cAMP a 10,24 pmol/ml en tampón acetato 0,05, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Se disuelve el patrón en 2,5 ml de tampón de ensayo para su uso.

1.4 Antisuero. Anticuerpo anti-cAMP en tampón acetato 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras reconstituir. Antes de su uso, se diluye el anticuerpo con 11 ml de tampón de ensayo y se mezcla por inversión suave para disolver los contenidos.

1.5 Conjugado de cAMP. cAMP-peroxidasa de rábano picante en tampón acetato 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Antes de su uso, se diluye la disolución con 11 ml de tampón de ensayo y se mezcla por inversión suave para disolver los contenidos.

1.6 Tampón de lavado. Tampón fosfato 0,01 M, pH 7,5, que contiene Tween™20 al 0,05% (v/v) tras reconstituir. Se transfieren los contenidos del frasco a una probeta utilizando lavados de agua destilada, 3 x 15 ml. El volumen final se ajusta a 500 ml.

1.7 Sustrato TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)/peróxido de hidrógeno en dimetilformamida al 20% (v/v).

[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

Preparado para su uso.

1.8 Reactivo de acetilación. 2 ml de anhídrido acético, 4 ml de trietilamina, preparado según sea necesario.

1.9 Acido sulfúrico (1M). Se prepara ácido sulfúrico 1 M a partir de una disolución madre 18M (BDH).
Se añaden 1,11 ml a 18,8 ml de agua destilada.

## 2. EQUIPAMIENTO ESPECIFICO

2.1 Tubos de ensayo de vidrio de 5 ml desechables.

2.2 Lector espectrofotométrico de placas (Spectra max 190)

2.3 Agitador de placas de microvaloración (Luckham R100).

## 3. PROCEDIMIENTOS

- Preparación de muestras de tejido. Se trataron los tejidos con el pretratamiento relevante en muestras de 5 ml en disolución salina fisiológica de, por ejemplo, agonistas, miméticos de cAMP, etc. Después del tratamiento, las muestras se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y después se trituraron utilizando un martillo. Se rascó el polvo en un tubo de centrífuga y se añadió 1 ml de ácido perclórico (PCA) 0,5 M enfriado con hielo. Se agitó en Vortex la muestra, se mezcló y se dejó en hielo durante 1 hora.

MORENO
L. MAN
nº, 113
MADRID
Telf.

- Extracción de cAMP de muestras de tejido. Se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en otros tubos de centrífuga. Se conservó el sedimento para análisis de proteína a -80°C. Se neutralizaron después las muestras de sobrenadante a pH 6 utilizando $K_3PO_4$. Se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se lavó 4 veces con 5 volúmenes (5 ml) de éter dietílico saturado de agua. Se desechó la capa superior de éter después de cada lavado. Se transfirió la capa acuosa a un tubo corto de vidrio fino y se secó en atmósfera de nitrógeno a 60°C. Se disolvió el extracto seco en 1 ml de tampón de ensayo y se almacenó en nevera hasta que fue necesario (o también puede congelarse).
- Se equilibran las disoluciones madre de los reactivos a temperatura ambiente y se preparan las disoluciones de trabajo.
- Se preparan los patrones de cAMP en tubos de vidrio etiquetados como 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 fmol. Esto se consigue añadiendo 1 ml de tampón de ensayo a todos los tubos excepto al de patrón de 512 fmol. Se añade entonces 1 ml de patrón de acetilación (10,24 pmol/ml) a los dos patrones superiores (256 y 512 fmol). Se agita en Vortex el patrón de 256 fmol y se transfiere 1 ml al patrón de 128 fmol. Esto se vuelve a llevar a cabo hasta el patrón

113
ADRID

de 2 fmol, en el que se dispone 1 ml de disolución. Se establece un tubo patrón cero que contiene 1 ml de tampón de ensayo.

- Se descongelan las muestras de extractos de tejidos en hielo (si es necesario) y se diluyen 1 a 100 (10 µl de muestra en 990 µl de tampón de ensayo) en tubos de vidrio etiquetados.
- Se acetila el cAMP en todos los patrones y muestras por adición de 100 µl de reactivo de acetilación, en campana de gases, que se añaden en un lado del tubo antes de la inmediata agitación en Vortex.
- Se añaden 50 µl de todos los patrones y muestras a los pocillos apropiados de la placa de 96 pocillos, y se añaden 150 µl de tampón de ensayo a los pocillos de unión no específica (NSB).
- Se añaden 100 µl de antisuero a todos los pocillos excepto los blancos (B) y a los NSB antes de incubar durante 2 horas a 3-5°C
- Después de la incubación, se añaden 100 µl de conjugado cAMP-peroxidasa a todos los pocillos excepto a los B antes de 1 hora más de incubación a 3-5°C.
- Se vacían las placas dándoles la vuelta y transfiriendo a un papel absorbente antes de lavar cada pocillo cuatro veces con 400 µl de tampón de lavado. Después de cada lavado se retransfieren las placas para

MORENO
MADRID
Telé.

asegurar que se extrae cualquier tampón de lavado residual. Se añaden inmediatamente después 200 $\mu$l de TMB a todos los pocillos.

- Se ponen las placas en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 100 $\mu$l de ácido sulfúrico 1 M en todos los pocillos. Se lee la densidad óptica en un dispositivo Spectra max 190 a 450 nm durante 30 minutos.

## 4. PATRONES

Se establecen con cada ensayo los siguientes tubos patrones:

### 4.1 Adición de un patrón en tampón de ensayo

Se añade una cantidad conocida de cAMP en tampón de ensayo para determinar la eficacia del ensayo. Se añaden 70 pmol/ml de cAMP al tampón de ensayo, que es equivalente a 35 fmol/pocillo en el ensayo, que está en la mitad de la curva de respuesta a la dosis.

Para preparar 1 ml de patrón: 68,4 $\mu$l de patrón 521 fmol/pocillo en 931,6 $\mu$l de tampón de ensayo

### 4. Efectos de los compuestos sobre la placa

Se establecen los patrones para determinar si el compuesto utilizado en los estudios funcionales tiene algún efecto sobre la placa de 96 pocillos o si afecta a la unión de cAMP. Estos incluyen:

- Adición del compuesto en tampón de ensayo por separado para evaluar los efectos del compuesto directamente sobre la placa.
- Adición del compuesto en plasma que contiene niveles basales de cAMP para evaluar los efectos del compuesto sobre la unión de cAMP a la placa.

Se añaden concentraciones 5 nM de compuesto a cada patrón. Se elige 5 nM porque los niveles de medicamento total al final de la infusión han sido en el pasado de aproximadamente 150-300 nM. Se diluyen las muestras 1:100 antes de ensayar, por lo tanto 5 nM permite concentraciones de medicamento mayores de las esperadas al final de la infusión.

### 5. CALCULOS

El lector de placas Spectra max lee la densidad óptica (DO) a 450 nm.

La curva patrón se genera por representación del %$B/B_0$ (eje y) frente a fmol/pocillo de cAMP (eje x) en Spectra max.

%$B/B_0$ (% unido) para cada muestra y patrón se calcula como sigue:
$B_0$ = patrón cero (véase el procedimiento 3.2).

$$\%B/B_0 = \frac{\text{(DO de patrón o muestra-DO de NSB)}}{\text{(DO de } B_0 \text{ - DO de NSB)}} \times 100$$

El volumen fmol/pocillo puede leerse entonces directamente en la curva patrón para cada muestra. Entonces se convierten los valores en pmol/ml antes de tomar la media de cada par de muestras.

Conversión de valores de fmol/pocillo a pmol/ml:

fmol a pmol = dividir entre 1000
volumen en pocillo = 50 $\mu$l ... (x1000)
50
La muestra se diluye 1/100, así que en conjunto = 1 x 1000/1000 x 100/50 = 2

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

Así que todos los valores de fmol/pocillo se multiplican por 2 para dar pmol/ml.

## MODELO DE ENSAYO ANIMAL

## LA POTENCIACION DE LOS EFECTOS DEL 3'-5'-MONOFOSFATO DE ADENOSINA CICLICO (cCAMP) DA COMO RESULTADO AUMENTOS DEL FLUJO SANGUINEO VAGINAL EN EL MODELO EN CONEJO ANESTESIADO DE EXCITACION SEXUAL.

### 1.0 Objetivos

1. Desarrollar y validar un modelo animal de excitación sexual femenina.
2. Identificar el (los) mecanismo(s) responsable(s) de la regulación del flujo sanguíneo genital en conejo anestesiado.
3. Identificar los enfoques potenciales para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo.
4. Investigar el(los) mecanismo(s) que subyacen en la relajación del músculo liso vaginal e identificar los enfoques potenciales para la estimulación de la relajación vaginal.

[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
Tel. [illegible]

1854

## 2.0 Introducción

La respuesta de excitación sexual normal consiste en una serie de respuestas fisiológicas que se observan durante la excitación sexual. Estos cambios, como congestión vaginal, labial y clitorídea son el resultado de aumentos en el flujo sanguíneo genital. La congestión conduce a un aumento de la lubricación a través de la trasudación de plasma, aumento de la flexibilidad vaginal (relajación del músculo liso vaginal) y aumento de la sensibilidad vaginal y clitorídea.

El trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) es un trastorno sexual altamente prevalente que afecta a mujeres pre, peri y postmenopáusicas (±HRT). La consecuencia primaria del FSAD es la falta de congestión o tumefacción, que se manifiesta como falta de lubricación vaginal y falta de sensación genital placentera. Las consecuencias secundarias incluyen una reducción del deseo sexual, dolor durante el coito y dificultades para conseguir un orgasmo. La causa más común de FSAD es una reducción del flujo sanguíneo genital que se traduce en una reducción de la congestión vaginal, labial y clitorídea. (Park 1997, Goldstein 1998, Berman 1999a, Werbin 1999).

PATRICIA POCH MORENO
ALEMAN
113
MADRID
Telf.

Como se ha explicado en la presente, la presente invención proporciona un medio para restablecer o potenciar la respuesta de excitación sexual normal en mujeres que sufren FSAD, estimulando el flujo sanguíneo genital.

En los estudios de los presentes autores se ha identificado el cAMP (3',5'-monofosfato de adenosina cíclico) como un mediador de la vasorrelajación vaginal utilizando tecnología de láser Doppler para medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo genital. Utilizando un inhibidor del metabolismo de VIP (un inhibidor NEP EC 3.4.24.11), se ha demostrado también que los aumentos del flujo sanguíneo genital observados durante la estimulación del nervio pélvico (es decir la excitación sexual) están mediados por VIP. Esto ha implicado desarrollar un modelo animal de excitación sexual y demostrar que los datos reflejan los cambios fisiológicos observados durante la excitación sexual femenina. El modelo se ha utilizado entonces para identificar y validar mecanismos que estimulan el flujo sanguíneo genital, por ejemplo por potenciación directa o indirecta de la vasorrelajación mediada por cAMP.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Telf.

## 3.0 Procedimientos

### 3.1 *Protocolo anestésico*

Se premedicaron conejos hembra de Nueva Zelanda (de aproximadamente 2,5 kg) con una combinación de medetomidina (Dormitor$^{(R)}$) 0,5 ml/kg intramuscular, y ketamina (Vetalar$^{(R)}$) 0,25 ml/kg intramuscular manteniendo la toma de oxígeno con una mascarilla facial. Se traqueotomizaron los conejos utilizando un tubo endotraqueal sin boquilla Portex™ 3ID conectado a un ventilador y se mantuvieron a una tasa de ventilación de 30-40 respiraciones por minuto, con un volumen de flujo periódico aproximado de 18-20 ml y una presión máxima en las vías aéreas de 10 cm de $H_2O$. Se cambió entonces la anestesia a isoflurano y siguió la ventilación con $O_2$ a 2 l/min. Se canuló la vena marginal de la oreja derecha utilizando un catéter 23G o 24G y se perfundió una disolución Ringer con lactato a 0,5 ml/min. Se mantuvo el conejo con isoflurano al 3% durante la cirugía invasiva, bajando a 2% para la anestesia de mantenimiento.

### 3.2 *Canulación de vasos*

Se afeitó el área de la ingle izquierda del conejo y se

MORENO

realizó una incisión vertical de aproximadamente 5 cm de longitud a lo largo del muslo. Se expusieron la vena y la arteria femorales, se aislaron y se canularon con un catéter de PVC (17G) para la infusión de medicamentos y compuestos. Se repitió la canulación para la arteria femoral, insertando el catéter a una profundidad de 10 cm para asegurar que el catéter alcanzaba la aorta abdominal. Se unió el catéter arterial a un sistema Gould para registrar la presión sanguínea. Se tomaron muestras para análisis de gases en sangre a través del catéter arterial. Se midieron las presiones sistólica y diastólica y se calculó la presión arterial media utilizando la fórmula (diastólica x 2 + sistólica) ÷ 3. Se midió el ritmo cardiaco mediante un oxímetro de pulsos y el sistema de software de adquisición de datos Po-ne-mah (Ponemah Physiology, Gould Instrument Systemas Inc.).

### 3.3 *Estimulación del nervio pélvico*

Se realizó una incisión ventral de línea media en la cavidad abdominal. La incisión fue de unos 5 cm de longitud justo por encima del pubis. La grasa y el músculo se apartaron directamente para descubrir el nervio hipogástrico que recorre la cavidad corporal. Era esencial mantenerse cerca del lado curvo de la pared del pubis para evitar dañar la vena y arteria femorales que se encuentran por encima del pubis. Los nervios ciático y pélvico se encuentran más profundos y fueron localizados después de una dirección adicional del lado dorsal del conejo. Una vez se identificó el nervio ciático, se localizó fácilmente el nervio pélvico. El término nervio pélvico se aplica aproximadamente, los libros de anatomía sobre el tema no consiguen identificar los nervios con suficiente detalle. Sin embargo, la estimulación del nervio produce un aumento del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo, y la inervación de la región pélvica. El nervio pélvico se liberó del tejido circundante y se colocó un electrodo estimulante Harvard dipolar alrededor del mismo. Se levantó ligeramente el nervio para proporcionar algo de tensión, después se aseguró el electrodo en la posición. Se colocó aproximadamente 1 ml de aceite de parafina ligera alrededor del nervio y el electrodo. Esto actúa como lubricante protector para el nervio y evita la contaminación de la sangre con el electrodo. Se conectó el electrodo a un estimulador Grass S88. Se estimuló el nervio pélvico utilizando los siguientes parámetros: 5V, anchura del pulso 0,5 ms, duración del estímulo 10 segundos e intervalo de frecuencia de 2 a 16 Hz. Se obtuvieron respuestas reproducibles cuando se estimuló el nervio cada 15-20 minutos.

MORENO
AN
113
RID

Se determinó una curva de respuesta a la frecuencia al inicio de cada experimento para determinar la frecuencia óptima para usar como respuesta submáxima, normalmente 4 Hz. El(los) compuesto(s) a ensayar se infundieron, a través de la vena femoral, utilizando una bomba de infusión Harvard 22, permitiendo un ciclo de estimulación continuo de 15 minutos.

### 3.4 *Colocación de las sondas de láser Doppler*

Se realizó una incisión ventral de línea media en el extremo caudal del pubis para exponer el área púbica. Se eliminó el tejido conectivo para exponer la túnica del clítoris, asegurando que la pared estaba libre de pequeños vasos sanguíneos. Se expuso también la pared vaginal externa por eliminación del tejido conectivo. Se insertó una sonda de flujo de láser Doppler 3 cm en la vagina, de modo que el eje de la sonda siguiera visible. Se posicionó una segunda sonda de modo que se encontrara justo por encima de la pared externa clitorídea. Se ajustó entonces la posición de estas sondas hasta obtener una señal. Se colocó una segunda sonda justo por encima de la superficie de un vaso sanguíneo de la pared vaginal externa. Ambas sondas se fijaron en sus posiciones.

PATRICIA [illegible] MORENO
ING [illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

Se registraron el flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo directamente como números a partir del medidor de flujo, utilizando el software de adquisición de datos Po-ne-mah (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument System Inc.), o indirectamente a partir de la señal del registro gráfico Gould. Se fijó la calibración al inicio del experimento (0-125 ml/min/100 g tejido).

### 3.5 *Infusión de péptido intestinal vasoactivo (VIP)*

Las dosis de VIP (Bachem, H-3775) infundidas fueron 2,0, 6,0, 20,0, 60,0 µg/kg intravenosas y se infundieron en un volumen de 0,5 ml de suero salino. El VIP se infundió utilizando una bomba Harvard 22, infundiendo a 500 µl/min a través de una llave de tres vías en la vena femoral. Después de la infusión de VIP, se lavó el catéter con suero salino heparinizado (Suero salino heparinizado) de modo que no quedara VIP en el catéter.

Para experimentos que utilizan infusiones de VIP, existía la necesidad de una curva de respuesta a la dosis de sensibilización inicial (2-60 µg/kg), para poder obtener respuestas reproducibles. Se infundió una infusión inicial de Suero salino heparinizado (50 UI/ml) que actuara como control negativo.

PATRICIA ... MORENO
... MADRID
Teléf. ...

1061

### 3.6 *Infusión de inhibidores*

Se prepararon inhibidores de NEP (endopeptidasa neutra EC3.4.24.11), inhibidores de fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE5) y antagonistas de NPY Y1 en suero salino o disolución de glucosa al 5% (200 µl de glucosa al 50% en 1,8 ml de agua para inyecciones). Los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ se disolvieron en una disolución de etanol al 40% (200 µl de glucosa al 50% en 1,8 ml de agua/etanol para inyecciones). Se infundieron los inhibidores y los controles de vehículo a la misma velocidad que el VIP. Los inhibidores de NEP se dejaron durante 30 minutos antes de la curva de respuesta a la dosis de VIP, mientras que los inhibidores de NEP, los antagonistas del receptor de NPT Y1 y los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ se dejaron durante 15 minutos antes de la estimulación del nervio pélvico.

### 3.7 *Medida de la relajación del músculo liso en vagina de conejo aislada*

3.7 (a). Preparación de vagina de conejo in vitro: Se sacrificaron conejos blancos hembras de Nueva Zelanda (2,0-3,0 kg) por dislocación cervical. Se abrió la cavidad abdominal y se extrajo la vagina. Se montaron longitudinalmente bandas de tejido en cámaras de órganos

PATRICIA [illegible] MORENO
Y ALEMAN
113
MADRID

silanizadas de 5 ml de Wesley Co. con suturas de seda trenzada (calibre 6/0) a una tensión en reposo inicial de 1,5 g en tampón bicarbonato de Krebs mantenido a 37°C y gasificado con 95% $O_2$/5% $CO_2$. Se unió la ligadura superior de cada banda de tejido a un transductor de desplazamiento de fuerza de 10 g de capacidad y se midieron y registraron los cambios en la fuerza isométrica utilizando un sistema de captura de datos in vitro DART. Se dejaron equilibrar los tejidos durante 1,5 horas y se lavaron regularmente con Krebs.

3.7 (b). Relajación inducida por el péptido intestinal vasoactivo en vagina de conejo: Se contrajo cada tejido utilizando una concentración de baño 1 μM de fenilefrina. Cuando la respuesta contráctil alcanzó una meseta estable (aproximadamente 15 minutos), se añadió acumulativamente VIP a la cámara de órganos en unidades logarítmicas para producir concentraciones de 0,1 a 100 nM. Se midieron las respuestas de relajación 5 minutos después de la adición de cada concentración de VIP, consiguiéndose la máxima relajación en ese momento. Después los tejidos recibieron un agente de ensayo (por ejemplo inhibidor de NEP o de PDE) o el vehículo DMSO (control coincidente en el tiempo).

3.7 (c). Análisis de datos para experimentos de relajación

MORENO
113
MADRID

por VIP: Para cada curva de respuesta concentración de VIP-relajación, se expresaron las respuestas de relajación inducidas por VIP como un porcentaje de la contracción máxima inducida por fenilefrina. Estos valores se representaron entonces frente al logaritmo de la concentración de VIP y se ajustaron a curvas sigmoideas. Con fines de ajuste de curvas, se limitó la respuesta de relajación mínima al 0% y se dejó ajustar libremente la máxima respuesta de relajación. Se determinó la concentración de VIP requerida para producir una relajación del 50% de la contracción de fenilefrina ($CE_{50\ PE}$).

3.7 (d). Relajación estimulada por campo eléctrico de vagina de conejo: Se prepararon las bandas vaginales de conejo como se ha descrito en la sección 3.7 (a). Se montaron las bandas de tejido entre dos electrodos de platino situados en la parte superior e inferior de la cámara de órganos, separados unos 4 cm. Cada tejido se contrajo utilizando una concentración de baño 1 μM de fenilefrina. Cuando la respuesta contráctil alcanzó una meseta estable (15 minutos), los tejidos experimentaron un pretratamiento de curva de relajación inducida estimulada por campo eléctrico (EFS). Este se realizó a entre 40 y 60 voltios utilizando frecuencias secuenciales de 2, 4, 8 y 16 Hz suministradas como series de 10 segundos con anchura

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible]
[illegible] MADRID
Telé[illegible]

de pulso de 0,5 ms. Se dejaron volver los tejidos a la línea base de tensión precontráctil entre cada frecuencia (5 minutos) y se registró la extensión de la respuesta de relajación.

Después de terminar el pretratamiento de curva de respuesta inducida por EFS, se lavaron todos los tejidos durante 15 minutos, dejando a los tejidos volver a la tensión de línea base. Entonces los tejidos recibieron un agente de ensayo (por ejemplo un inhibidor de NEP o de PDE, un inhibidor de óxido nítrico sintasa (NOS)) o vehículo DMSO (control coincidente en el tiempo). Se recontrajeron los tejidos con fenilefrina (1 $\mu$M) 15 minutos después de la adición del compuesto o del vehículo y se determinó una curva de respuesta de relajación inducida por EFS como se ha descrito anteriormente.

Para los experimentos EFS, se complementó el medio Krebs con atropina (10 $\mu$M) y guanetidina (150 $\mu$M) para eliminar cualquier inervación colinérgica o adrenérgica de la vagina.

### 3.8 *Medida de los niveles de cAMP en vagina de conejo aislada*

PATRICIA MORENO
MADRID

Se realizó la medida de las concentraciones de cAMP a partir de extractos de tejido vaginal utilizando un estuche de enximoinmunoensayo (EIA) de cAMP Biotrak (Amersham Life Sciences, RPN 225). Se trataron las muestras de tejido vaginal aislado con agentes de ensayo (por ejemplo forscolina o VIP). Después de 5 minutos, se congelaron inmediatamente las muestras utilizando nitrógeno líquido, se homogeneizaron y se extrajo el cAMP. Se miden los niveles de cAMP por EIA. El EIA está basado en la competición entre el cAMP sin marcar y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa para una cantidad limitada de anticuerpo específico de cAMP.

### 3.9 *Medida de la actividad fosfodiesterasa (PDE) en vagina de conejo aislada*

Se obtuvieron extractos de citosol de pared vaginal humana de ABS Inc., Delaware (edad de las donantes de 41 a 60 años). Se separaron las isoenzimas PDE por cromatografía de intercambio aniónico Mono-Q y se caracterizaron basándose en su selectividad de sustrato, en su sensibilidad a moduladores alostéricos y en sus inhibidores selectivos. También se realizaron análisis Western utilizando anticuerpos de isoenzimas específicas de PDE para detectar la expresión de PDE en la vagina humana.

MORENO
MADRID

Todos los datos se comunican como media ± s.e.m. Los cambios significativos se identificaron utilizando ensayos de t de Student.

## 4.0 Resultados y Discusión

### 4.1 *Modelo animal de excitación sexual*

En los estudios, de los presentes autores se ha desarrollado un modelo reproducible y robusto de la fisiología de la excitación sexual. Utilizando este modelo en conejo anestesiado, son capaces de medir pequeños cambios del flujo sanguíneo genital utilizando tecnología de láser Doppler. La estimulación del nervio pélvico se utiliza para simular los efectos neuronales de la excitación sexual.

Se ha encontrado que la estimulación del nervio pélvico inducía aumentos dependientes de la frecuencia del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo (véase la figura 1). Los aumentos del flujo sanguíneo vaginal son significativos cuando se registran en la pared intra o extravaginal. La estimulación del nervio pélvico a 2Hz indujo una elevación media del flujo sanguíneo vaginal máximo de 10,3 ± 1,8, a 4 Hz 20,0 ± 4,6, a 8 Hz 36,3 ± 4,8 y a 16 Hz 46,6 ± 4,7 ml/min/100 g de tejido (n= 4), 15-20 V, 0,5 ms, 10 s) y aumentos del flujo sanguíneo clitorídeo de 14,7 ± 3,6 a 2 Hz, 29,4 ± 1,4 a 4 Hz y 69,7 ± 2,1 a 8 Hz. Estos valores son de amplitud similar a los observados anteriormente en estudios humanos y en modelos animales de excitación (Berman 1999a, Park 1997).

Se ha encontrado que la estimulación submáxima del nervio pélvico da como resultado aumentos reproducibles del flujo sanguíneo genital (por ejemplo la estimulación con 4 Hz cada 15 minutos proporcionó un aumento medio del flujo sanguíneo vaginal de 8,50 ± 0,10 ml/min/100 g de tejido, n= 8 y un aumento medio del flujo sanguíneo clitorídeo de 13,65 ± 0,86 ml/min/100 g de tejido, n= 11). Esta reproducibilidad se mantiene durante hasta 5 horas. Podemos utilizar la reproducibilidad de estas respuestas para investigar a) la identidad de los agentes/mecanismos vasoactivos endógenos que median la congestión genital y b) la influencia de los medicamentos que pueden ser eficaces en la estimulación del flujo sanguíneo vaginal y/o clitorídeo

Encontramos que no hay efectos cardiovasculares adversos asociados a la estimulación del nervio pélvico en el conejo anestesiado (véase la figura 3).

[illegible] MORENO [illegible] RID

El flujo sanguíneo genital aumenta durante la excitación sexual (Berman, 1999) a través de un aumento del suministro de sangre arterial (la arteria vaginal, la rama vaginal de la arteria uterina, la arteria genital interna y las ramas medias de la arteria media rectal están todas implicadas en el suministro de sangre a la vagina y el clítoris). El nervio pélvico, que tiene su origen en las regiones espinales S2/S4, inerva los genitales femeninos y tiene ramas que terminan en la vagina inferior, el clítoris y los vasos sanguíneos relacionados. Mediante la estimulación del nervio pélvico, se puede simular los efectos sobre el flujo sanguíneo observados durante la excitación sexual, es decir, un aumento del flujo sanguíneo genital arterial. De forma interesante, el aumento de flujo sanguíneo arterial no se ve reflejado en un vaciado venoso que permita a las redes capilares congestionarse con la sangre. La congestión vaginal conduce a la lubricación vaginal a través de trasudación de plasma y esta es una de las primeras respuestas pélvicas observadas durante la estimulación sexual. Los neurotransmisores que se liberan con la estimulación del nervio pélvico o durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. Los nervios que contienen los neuropéptidos y otros candidatos a neurotransmisores que inervan la vasculatura y microvasculatura de la vagina y del clítoris, han sido

PATRICIA KOCH MORENO
MADRID

identificados inmunohistoquímicamente. Estos estudios indican que el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), el neuropéptido Y (NPY), la óxido nítrico sintasa (NOS), la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) están todos presentes en los nervios que inervan la vagina y el clítoris humanos. (Hoyle, 1996, Burnett, 1997, Hauser-Kronberger, 1999).

### 4.2 *Validación del modelo de conejo anestesiado de excitación sexual*

Para traducir los datos de flujo sanguíneo generados utilizando este modelo a los observados en un modelo humano de excitación sexual, se compara directamente los datos de los presentes autores con datos de flujo sanguíneo vaginal y cardiovascular generados en estudios preclínicos.

Se ha encontrado que la infusión de VIP tiene los siguientes efectos en el modelo en conejo de excitación sexual:

- El VIP exógeno (bolo intravenoso) induce aumentos dependientes de la concentración significativos del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2a). Estos aumentos son significativamente elevados por encima de los valores de

MORENO
AN
13
ADRID

flujo sanguíneo basal cuando se registran en la pared intra- o extravaginal. El flujo sanguíneo vaginal aumentó significaticamente en 24,7 ± 3,6 ml/min/100 g de tejido con una administración intravenosa de VIP (60 µg/kg). El flujo sanguíneo permaneció elevado por encima del basal durante aproximadamente 11 minutos después de la infusión. Dosis menores indujeron aumentos menores, por ejemplo 6,0 µg/kg elevaron el flujo sanguíneo en 7,5 ± 1,3 ml/min/100 g de tejido y el flujo sanguíneo se elevó durante 7 minutos después de la infusión.

- Las infusiones repetidas de dosis similares de VIP (intravenoso en intervalos de 30 minutos) inducen aumentos reproducibles significativos en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b).

- El VIP (intravenoso) aumenta significativamente el ritmo cardiaco y reduce la presión sanguínea arterial media (véase la figura 3). A 6,0 µg/kg de VIP (intravenoso) se produjo una reducción significativa de la presión sanguínea arterial media de 13,2 ± 0,7 mm Hg y un aumento significativo del ritmo cardiaco de 16 ± 4 latidos por minuto.

Este modelo animal refleja directamente los datos clínicos

MADRID

observados por infusión de VIP en voluntarias sanas, es decir, aumento del flujo sanguíneo vaginal, una presión sanguínea deprimida y un ritmo cardiaco elevado. Por lo tanto, este modelo puede utilizarse para investigar el (los) mecanismo(s) que subyace(n) a los cambios fisiológicos que aparecen durante la excitación sexual y para validar además los nuevos enfoques de la estimulación del flujo sanguíneo vaginal y por ello del tratamiento de FSAD.

### 4.3 *Cambios inducidos por el VIP en el flujo sanguíneo vaginal mediante la estimulación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa*

Ottesen y colaboradores demostraron que el VIP induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal y en la lubricación en voluntarias sanas. Sin embargo, el mecanismo por el que el VIP ejerce este efecto no está claro. En la bibliografía hay muchos ejemplos de señalización de VIP mediante diferentes segundos mensajeros, incluyendo cGMP/guanilato ciclasa (Ashur-Fabian, 1999), monóxido de carbono/hemo oxigenasa (Fan, 1998) y cAMP/adenilato ciclasa (Schoeffer, 1985, Gu, 1992, Foda, 1995). Esto se ejemplifica por un reciente artículo que describe cómo los efectos relajantes de VIP en la arteria uterina pueden explicarse por la

MORENO
113
ADRID

liberación de óxido nítrico (Jovanovic, 1998). De forma interesante, existen también evidencias de que NO/cGMP modula el VIP en la función urogenital masculina (Kim, 1994) y existen evidencias directas de que el tratamiento de cultivos celulares de músculos lisos vaginales humanos con VIP (0,5 μM) no consigue elevar los niveles de cAMP (Traish, 1999, ibidem).

En este estudio los presentes autores han mostrado que el VIP induce la vasorrelajación mediante la elevación de los niveles de cAMP intracelular. Realizando una serie de experimentos funcionales se ha medido el flujo sanguíneo y la relajación del músculo liso además de medir bioquímicamente las concentraciones de cAMP intracelular. Se ha utilizado forscolina, un activador de adenilato ciclasa, o un mimético de cAMP, para imitar los efectos de la activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa. El VIP y la forscolina tienen efectos idénticos sobre los efectos fisiológicos de la excitación sobre el flujo sanguíneo vaginal y la relajación.

El VIP (20 μg/kg) y la forscolina (40 nmol/kg) inducen aumentos significativos del flujo sanguíneo vaginal, 13,2 y 12,7 ml/min/100 mg de tejido respectivamente (véase las figuras 2a y 4a). Estos cambios en la amplitud inducida por

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
113
MADRID
Telef

VIP y forscolina no eran significativamente diferentes. Estos aumentos son significativamente elevados por encima de los valores de flujo sanguíneo basal registrados en la pared intra o extravaginal.

El VIP (0,1 µM) y la forscolina (10 µM) aumentaron ambos significativamente las concentraciones intracelulares de cAMP por encima de los niveles basales en tejido vaginal aislado (véase la figura 4b).

El VIP (0,1 µM) y la forscolina (10 µM) elevan las concentraciones basales de 276 nM en un 156% y un 238%, respectivamente. Las diferencias en estos porcentajes reflejan la diferencia de concentraciones de VIP y forscolina utilizados, por ejemplo el VIP a una concentración de 0,1 µM relaja la vagina aislada precontraída en aproximadamente un 80%, mientras que la forscolina 10 µM es suficiente para relajar completamente el tejido aislado.

Además, los presentes autores muestran que el VIP y forscolina inducen la relajación en tejido vaginal aislado con valores de $CE_{50}$ de 18,8 ± 0,6 nM y 320 ± 20 nM respectivamente (véase la figura 4c).

PATRICIA KOCH MORENO
ING. ... MAN
... 113
... MADRID
Telé.

Estos datos establecen que el VIP induce la vasorrelajación vaginal a través de la ruta cAMP/adenilato ciclasa, por ello este modelo puede utilizarse para investigar si la estimulación del nervio pélvico, es decir la excitación sexual, conduce a la liberación de VIP/activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa. Además, pueden investigarse los enfoques para estimular el flujo sanguíneo vaginal durante la excitación sexual, por ejemplo estimulando directa o indirectamente la señalización de cAMP.

### 4.4 *cAMP es el mediador de la vasorrelajación vaginal*

Los candidatos a neurotransmisor y segundo mensajero responsables de los aumentos del flujo sanguíneo vaginal durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. Hasta la fecha, los investigadores se han centrado en la ruta del óxido nítrico (NO)/cGMP. Según la presente invención, se ha demostrado que: 1) la ruta cAMP/adenilato ciclasa media los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal. 2) el VIP es un neurotransmisor endógeno liberado durante la excitación sexual y 3) el VIP liberado endógenamente induce efectos vasorrelajantes mediante la elevación de los niveles de cAMP.

PATRICIA ... MORENO
... MAN
... 13
...DRID
Telé...

El neurotransmisor responsable de la relajación de la pared vaginal está actualmente sin identificar. Los presentes autores han mostrado que el VIP es el neurotransmisor que se libera por estimulación del nervio pélvico y que cAMP media la vasorrelajación mediada por VIP. Los agentes que evitan el metabolismo de VIP o que estimulan directamente la señalización de cAMP, potencian los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal, por ejemplo inhibidores de NEP o inhibidores de $PDE_{cAMP}$, respectivamente (véanse las siguientes secciones).

En los estudios de los presentes autores se ha encontrado que se puede excluir el papel del NO en la relajación vaginal inducida por VIP. Un potente y selectivo inhibidor de PDE de tipo 5 tiene un efecto mínimo sobre la relajación inducida por VIP de músculo liso vaginal aislado (estimulaciones del 30% de relajaciones inducidas por VIP, véase la tabla 1).

Tabla 1: Estimulación de la relajación mediada por VIP de vagina de conejo aislada. Esta tabla ilustra el porcentaje de estimulación de la $CE_{50}$ para relajaciones mediadas por VIP de músculo liso vaginal precontraído (fenilefrina 1 $\mu$M ). Los inhibidores selectivos de $PDE_{cAMP}$ de tipos 1, 2, 3 y 4 potenciaron todos significativamente las relajaciones

[illegible] MORENO
[illegible] DRID

1876

mediadas por VIP, mientras que un inhibidor selectivo de PDE$_{cAMP}$ de tipo 5 o un control de vehículo no tuvieron efecto sobre las relajaciones mediadas por VIP.

| Inhibidor de PDE a dosis selectiva | Porcentaje de estimulación de la relajación inducida por VIP |
|---|---|
| PDE$_{cAMP}$ de tipo 1 | 210% |
| PDE$_{cAMP}$ de tipo 2 | 130% |
| PDE$_{cAMP}$ de tipo 3 | 220% |
| PDE$_{cAMP}$ de tipo 4 | 160% |
| PDE$_{cAMP}$ de tipo 5 | Sin efecto (30%) |
| Control de vehículo | Sin efecto |

Los presentes autores han mostrado que el VIP es también el neurotransmisor endógeno NANC (no adrenérgico, no colinérgico) parcialmente responsable de las relajaciones inducidas por EFS de músculo liso vaginal aislado. Una dosis elevada de inhibidor de óxido nítrico sintasa (L-NOARG, 300 μM) inhibe sólo el 50% de las relajaciones inducidas por EFS. Un inhibidor de NEP (1 μM) que evitará el metabolismo de VIP inducido por NEP, y que por lo tanto estimula la señalización de VIP, estimula la relajación

PAT. [illegible] MORENO
RID

1877

NANC, que no depende de óxido nítrico, inducida por EFS. Han mostrado que tanto NO como VIP regulan el tono del músculo liso en la pared vaginal. Terapéuticamente será posible estimular las relajaciones del músculo liso vaginal con agentes que estimulan la señalización mediada por NO/cGMP y/o VIP/cAMP.

### 4.5 *VIP induce la vasorrelajación clitorídea mediante la ruta del cAMP*

Los candidatos a neurotransmisor y segundo mensajero responsables del aumento de flujo sanguíneo clitorídeo durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. En consonancia con la investigación actual sobre flujo sanguíneo vaginal, los trabajos han especulado y se han centrado en la ruta del óxido nítrico (NO)/cGMP. No hay informes de que el VIP juegue un papel en la mediación del flujo sanguíneo clitorídeo/congestión aunque se han visualizado neuronas que contienen VIP en tejido clitorídeo (Hauser-Kronberger et al, 1999).

En este estudio los presentes autores demuestran que:

1. La infusión de VIP aumenta el flujo sanguíneo clitorídeo.
2. La ruta de cAMP/adenilato ciclasa media los aumentos

MORENO
MADRID

inducidos por VIP del flujo sanguíneo clitorídeo.

3. El VIP es un neurotransmisor clitorídeo endógeno que se libera durante la excitación sexual:

1. La infusión de VIP (60-200 µg/kg, bolo intravenoso) induce un aumento dependiente de la concentración del flujo sanguíneo clitorídeo (figura 5). Se observó un aumento del 115% del flujo sanguíneo clitorídeo después de una infusión intravenosa de 200 µg/kg de VIP. Esto era significativamente elevado respecto de las infusiones de control (Suero salino heparinizado).

2. Los efectos de VIP sobre el flujo sanguíneo clitorídeo pueden imitarse por una infusión de un mimético de cAMP, la forscolina (40 nmol/kg, bolo intravenoso, figura 5). Se observó un aumento del 156% del flujo sanguíneo clitorídeo después de una infusión intravenosa de forscolina, 40 nmol/kg. Esto era significativamente elevado respecto de las infusiones de control (Suero salino heparinizado). Obsérvese que la amplitud de la respuesta es similar a la inducida por VIP (200 µg/kg, bolo intravenoso) y comparable a las observadas en el flujo sanguíneo vaginal en las figuras 2 y 4.

3. Los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes estimulan significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico en el flujo sanguíneo clitorídeo (véase la figura 12). Un inhibidor de

MORENO ADRID

NEP estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo clitorídeo hasta un 131% comparado con los aumentos de los controles de vehículo.

Estos datos establecen que el VIP es capaz de aumentar el flujo sanguíneo clitorídeo/vasorrelajación y que esto puede imitarse por activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa. El descubrimiento de que un inhibidor de NEP EC3.4.24.11 (responsable del metabolismo de VIP) potencia el aumento estimulado por el nervio pélvico en el flujo sanguíneo clitorídeo, demuestra que el VIP es un neurotransmisor que se libera durante la estimulación del nervio pélvico/estimulación sexual.

### 4.6 *El flujo sanguíneo genital es estimulado por agentes farmacológicos que elevan directa o indirectamente los niveles de cAMP.*

FSAD está asociado a, y puede dar como resultado, una reducción del flujo sanguíneo genital. Los enfoques potenciales para tratar esta enfermedad giran aproximadamente la estimulación del flujo sanguíneo genital. Habiendo establecido que cAMP es el mediador de la vasorrelajación genital y que las elevaciones de cAMP que resultan del VIP liberado neuronalmente, los presentes

PAT. ... MORENO
MADRID
Telf.

autores creen que si se estimula la señalización de cAMP, como consecuencia aumentará el flujo sanguíneo genital, restableciendo así el flujo sanguíneo genital a niveles normales y tratando el FSAD.

En un aspecto altamente preferido, los presentes autores han elegido tres objetivos para estimular directa o indirectamente la vasorrelajación mediada por cAMP: los inhibidores de $PDE_{cAMP}$, por ejemplo los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2, los inhibidores de NEP (EC 3.4.24.11) y los antagonistas del receptor de neuropéptido Y Y1 (NPY Y1).

### 4.6.1 Inhibidores de endopeptidasa neutra (NEP EC 3.4.24.11)

La NEP EC 3.4.24.11 metaboliza el VIP y por ello finaliza la actividad biológica mediada por VIP. Los inhibidores de NEP potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del VIP liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión genital.

No ha habido informes previos en la bibliografía sobre la localización de NEP EC 3.4.24.11 o de su papel funcional en el tejido vaginal o de su papel en la excitación sexual.

Los inhibidores selectivos de NE EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos estimulados por nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 6).

Un inhibidor de NEP estimulaba el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal hasta un 53% comparado con los aumentos del control coincidente en el tiempo. Esta potenciación de las frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4 Hz), era dependiente de la dosis, por ejemplo 0,1 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 35,0 ± 7,6%, 0,3 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 42,6 ± 27,7% y 1,0 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 52,8 ± 32,5%. Los inhibidores de NEP no tuvieron efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (sin estimular). Por ello, los agentes de la presente invención estimulan la excitación potenciando la señalización de cAMP, más que induciendo la excitación en ausencia de deseo sexual, es decir por aumento directo de la señalización de cAMP.

Los inhibidores selectivos de EP EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico en el flujo sanguíneo clitorídeo (véase la figura 12). Un inhibidor de NEP estimulaba el aumento del pico del flujo sanguíneo

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] RID

clitorídeo hasta un 131% comparado con los aumentos del control de vehículo. Los inhibidores de NEP no tuvieron efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (sin estimular). Esto apoya aún más la creencia de los presentes autores de que los agentes de la presente invención estimularán la excitación potenciando la señalización de cAMP, más que induciendo la excitación en ausencia de deseo sexual, es decir por aumento directo de la señalización de cAMP.

Los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes estimulan significativamente los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo vaginal comparados con los controles coincidente en el tiempo. A dosis submáximas de VIP (por ejemplo 6,0 μg/kg) hay una potenciación significativa tanto en el aumento del pico (95 ± 6%) como en la prolongación de la duración de la estimulación (aproximadamente 140%, desde 7 hasta más de 17 minutos, véase la figura 7). Los inhibidores de NEP prolongan significativamente la duración de la elevación inducida por VIP del flujo sanguíneo vaginal cuando se proporcionan en combinación con una dosis de VIP que produce los aumentos de flujo máximos (aproximadamente un 80% de aumento en una duración de 11 a 20 minutos).

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] ALEMAN
MADRID
Telf.

Los inhibidores de NEP a dosis clínicamente relevantes estimulan significativamente las relajaciones inducidas por VIP y mediadas por nervio en tejido aislado. La $CE_{50}$ de VIP se reduce significativamente de 18,8 ± 0,6 nM a 2,9 ± 0,3 nM en presencia de un inhibidor selectivo de NEP (1 μM). El efecto del inhibidor de NEP es dependiente de la concentración.

Se expresan el RNA mensajero y la proteína de NEP EC 3.4.24.11 y se han identificado en vagina humana y de conejo por análisis Northern y Western.

### 4.6.2 Inhibidores de los fosfodiesterasa (PDE)

El cAMP es degradado por la PDE hidrolizante de cAMP, es decir, $PDE_{cAMP}$. Los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del cAMP liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No hay informes en la bibliografía sobre la localización de $PDE_{cAMP}$ o sobre un papel funcional de estas isoenzimas en tejido vaginal, o de un papel en la excitación sexual. Los presentes autores han mostrado, por perfiles de PDE de vagina humana y de conejo, que están presentes las

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y LEMAN
113
MADRID
Tel.

siguientes isoenzimas de $PDE_{cAMP}$ 1, 2, 3, 4, 7 y 8. Los inhibidores de estas $PDE_{cAMP}$ representan agentes potenciales para estimular el flujo sanguíneo vaginal y/o relajar el músculo liso vaginal.

Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 a dosis clínicamente relevantes potencia significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 8). Un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 (500 µg/kg, intravenoso) estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal en 86,8 ± 21,9% comparado con el aumento observado durante el control coincidente en el tiempo (a 4 Hz).

Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimuló significativamente la duración del aumento inducido por VIP (60 µg/kg) del pico de flujo sanguíneo vaginal por encima del 100% (medido a una amplitud del 50%, véase la figura 9). El inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimuló significativamente el aumento de pico del flujo sanguíneo inducido por la estimulación de VIP (en aproximadamente un 15 ± 3% [200 µg/kg]).

[Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2] estimuló significativamente la duración de los aumentos inducidos

PATRICIA KOCH MORENO
ING. S Y ALEMAN
113
MADRID
Teléf.

por VIP del pico del flujo sanguíneo vaginal por encima del 100% (medido a una amplitud del 50%, véase la figura 8). El inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula significativamente el aumento del pico del flujo sanguíneo inducido por estimulación del nervio pélvico (en aproximadamente un 15 ± 3% [200 μg/kg] a 4 Hz).

Los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ estimulan las relajaciones inducidas por VIP de músculo liso vaginal aislado precontraído (fenilefrina 1 μM, véase la tabla 1). Los inhibidores selectivos de $PDE_{cAMP}$ de tipos 1, 2, 3 y 4 potenciaban todos significativamente las relajaciones mediadas por VIP (210% a 76 nM, 130% a 8 nM, 220% a 3,4 μM y 160% a 686 nM de potenciación de los valores de VIP $CE_{50}$). Estos inhibidores se administraron a dosis que se sabían selectivas para el $PDE_{cAMP}$ de interés. El inhibidor selectivo de $PDE_{cGMP}$ de tipo 5 o el control de vehículo no tenían un efecto viable en las relajaciones mediadas por VIP.

### 4.6.3 Antagonistas del receptor de NPY Y1

El NPY ejerce una influencia inhibitoria sobre la vasorrelajación mediada por VIP y los antagonistas del receptor de NPY Y1 facilitarán el efecto vasorrelajante del

MORENO
MAN
113
ADRID

1886

VIP endógeno liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No existen informes en la bibliografía sobre la localización del receptor de NPY o de un papel funcional para estos receptores en tejido vaginal o un papel en la excitación sexual.

Los estudios de expresión del receptor de NPY han identificado por análisis Northern y Western que los subtipos de receptor de NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$ están presentes en vagina humana y de conejo.

Los inhibidores selectivos de NPY Y1 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 10). Un antagonista de NPY Y1 estimuló el aumento de pico del flujo sanguíneo vaginal hasta un 92% comparado con los aumentos del control coincidentes en el tiempo. Esta potenciación de las frecuencias submáximas de estimulación (por ejemplo 4 Hz) era dependiente de la dosis, por ejemplo, 0,01 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 15,8 ± 19,6%, 0,03 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 35,1 ± 17,17%, 0,10 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 60,1 ± 16,9% y 0,3 mg/kg

[illegible] MORENO
[illegible] AN
INO [illegible] 113
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

1887

intravenoso indujo un aumento de 91,9 ± 27,4% (media ± s.e.m., n= 3). Los antagonistas de NPY Y1 no tuvieron efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (sin estimular). Esto refuerza la creencia de los presentes autores de que estimularán la excitación potenciando la señalización de cAMP, más que induciendo la excitación en ausencia de deseo sexual, es decir por aumento directo de la señalización de cAMP.

### 4.7 *Efectos de los agentes que estimulan cAMP o que aumentan el flujo sanguíneo vaginal sobre la presión sanguínea arterial media en conejo anestesiado.*

En la búsqueda de una terapia oral para FSAD, es deseable que no haya efectos cardiovasculares adversos asociados, por ejemplo efectos sobre la presión sanguínea o sobre el ritmo cardiaco. En los estudios de los presentes autores se ha encontrado que las infusiones de VIP reducen significativamente la presión sanguínea arterial media (véase la figura 3) y aumentan significativamente el ritmo cardiaco. Por ello, en un agente altamente preferido, el agente no es VIP. La estimulación del nervio pélvico y los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ y la NEP, sin embargo, no tuvieron efecto sobre la presión sanguínea. A 6,0 µg/kg (intravenoso), el VIP produjo un aumento significativo del

MORENO
MAN
13
DRID

ritmo cardiaco de 16 ± 4 latidos por minuto. A dosis mayores tal como 60 µg/kg (intravenoso), el VIP produjo una reducción significativa en la presión sanguínea arterial media de 14,7 ± 1,37 mm Hg y esto se asoció a un aumento significativo del ritmo cardiaco de 111 ± 30 latidos por minuto, lo que aumentó entonces la presión sanguínea arterial media a 8,5 ± 1,4 mm Hg.

COMPUESTOS ENSAYADOS

Se ensayaron una serie de los compuestos mencionados anteriormente según la presente invención y se encontraron eficaces según la presente invención, es decir, pueden actuar como $P_{cAMP}$ para tratar la FSD, en particular del FSAD.

Estos compuestos incluían:

Compuesto de fórmula Ia ("FIa"): a saber, 5-[4-(dietilamino)bencil]-1-metil-3-propil-6,7-dihidro-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona. El FIa puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0911333 (ejemplo 50 de éste).

Compuesto de fórmula II ("FII"): a saber, 9-(1-acetil-4-

MORENO
MAN
113
MADRID
Telé..

feinlbutil)-2-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona. El FII puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0771799 (ejemplo 100 de éste).

Compuesto de fórmula III ("FIII"): a saber, milrinona. El FIII es un producto comercialmente disponible.

Compuesto de fórmula IV ("FIV"): a saber, rolipram. El FIV es un producto comercialmente disponible.

Compuesto de fórmula V ("FV"): a saber, éster 3-[[[1-(2-carboxi-4-pentenil)ciclopentil]carbonil]amino]-1-etílico del ácido ciclohexanocarboxílico. El FV puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0274234 (ejemplo 300 de éste).

Compuesto de fórmula VI ("FVI"): a saber, éster 3-[[[1-(2-carboxi-4-pentenil)ciclopentil]carbonil]amino] del ácido ciclohexanocarboxílico. El FVI puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0274234 (ejemplo 379 de éste).

En particular, los compuestos FIa, FII, FIII y FIV son inhibidores de $PDE_{cAMP}$. FIa es un I:PDEI, FII es un I:PDEII,

MORENO
AN
113
ADRID
Teléf.

FIII es un I:PDEIII y FIV es un I:PDEIV.

Los datos para estos compuestos se presentan anteriormente en las secciones de ejemplos anteriores, por ejemplo véase la tabla 1.

Como resulta evidente, estos inhibidores de PDE$_{cAMP}$ estimulan las relajaciones inducidas por VIP de tejido aislado.

El FII, que es un I:PDEII selectivo, estimula los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relevantes.

El FII potencia también los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y El FVI son inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11.

Los datos presentados anteriormente en las secciones de ejemplos anteriores son para el FVI. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares para el FV.

MADRID

Como resulta evidente, el FV y el FVI estimulan los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI potencian también los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI estimulan también las relajaciones inducidas por VIP y mediadas por el nervio de tejido aislado a dosis clínicamente relevantes.

Los compuestos adicionales que se ensayaron y probaron ser eficaces incluyen:

Acido 2-[(1-{[1-bencil-6-oxo-1,6-dihidro-3-piridinil)amino]carbonil}ciclopentil)metil]-4-metoxibutanoico (F57).

Acido 2-{[1-({[3-(2-oxo-1-pirrolidinil)propil]amino}-carbonilciclopentil]metil}-4-fenilbutanoico (F58).

Acido (+)-2-{[1-({[2-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1H-inden-2-il]amino}carbonil)ciclopentil]metil}-4-fenilbutanoico (F59).

... MORENO
... AN
... 113
... MADRID
Telf. ...

1892

Acido 2-[(1-{[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino]carbonil}ciclopentil)metil]-4-fenilbutanoico (F60).

Acido cis-3-(2-metoxietoxi)-2-[(1-{[(4-{[(fenilsulfonil)amino]carbonil}ciclohexil)amino]carbonil}ciclopentil)metil]propanoico (F61).

Acido (+)-2-{[1-({[2-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1H-inden-2-il]amino}carbonil)ciclopentil]metil}pentanoico (F62).

Acido (+)-2-[(1-{[(5-etil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino]carbonil}ciclopentil)metil]pentanoico (F63).

Acido 2-({1-[(3-bencilanilino)carbonil]ciclopentil}-metil)pentanoico (F64).

Acido 2-[(1-{[(1-bencil-6-oxo-1,6-dihidro-3-piridinil)amino]carbonil}ciclopentil)metil]pentanoico (F65).

Acido 2-{[1-({[(1R,3S,4R)-4-(aminocarbonil)-3-butilciclohexil]amino}carbonil)ciclopentil]metil}pentanoico (F66).

MORENO
LIMAN
113
MADRID
Telf.

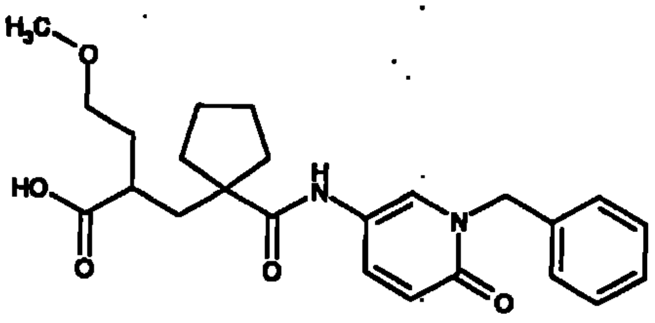
Cada uno de los compuestos F57-66 es un I:NEP.

SINTESIS DE COMPUESTOS F57-66

En el siguiente comentario, los ejemplos de preparación son la síntesis de intermedios, mientras que los ejemplos son la síntesis de los compuestos respectivos de la presente invención.

## Ejemplo 1

Acido 2-[(1-{[1-bencil-6-oxo-1,6-dihidro-3-piridinil)amino]carbonil}ciclopentil)metil]-4-metoxibutanoico (F57).



Se hidrogenó a 207 kPa y temperatura ambiente durante 30 minutos una mezcla de éster bencílico de la preparación 1 (1/62) (850 mg, 1,64 mmol) y paladio al 5% sobre carbono (250 mg) en etanol acuoso al 40% (21 ml). Se filtró la mezcla de reacción a través de Hyflo$^{(R)}$ y se evaporó el filtrado a presión reducida. Se purificó la espuma residual

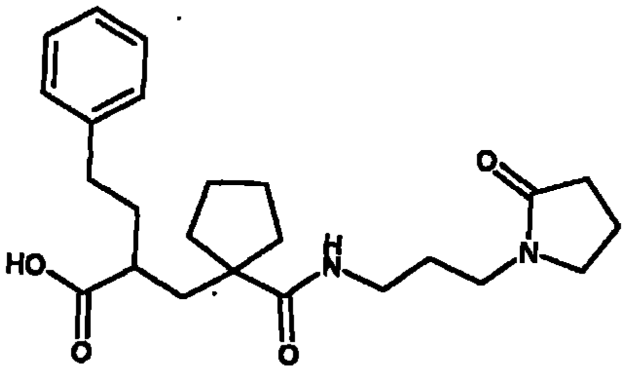
[illegible] AN
113
MADRID

por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando diclorometano:metanol (97:3) como eluyente proporcionando el compuesto del título en forma de una espuma blanca, 550 mg, 79%. RMN-$^1H$ (DMSO-$d_6$, 300 MHz) δ: 1,24-2,17 (m, 12H), 2,18-2,31 (m, 1H), 3,07 (s, 3H), 3,21 (t, 2H), 5,08 (s, 2H), 6,63 (d, 1H), 7,23-7,41 (m, 5H), 7,72 (d, 1H), 8,24 (s, 1H).

Anal. Encont. C 67,46, H 7,18, N 6,24. $C_{24}H_{30}N_2O_5$ requiere C 67,58, H 7,09, N 6,57%.

## Ejemplo 2

### Acido 2-{[1-({[3-(2-oxo-1-pirrolidinil)propil]amino}-carbonilciclopentil]metil}-4-fenilbutanoico (F58).



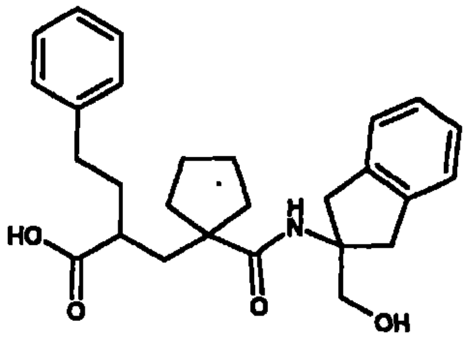
Se hidrogenó a 414 kPa de presión de $H_2$ y temperatura ambiente durante 1,5 horas una mezcla de éster bencílico de la preparación 3 (3/67) (780 mg, 1,55 mmol) y paladio al 10% sobre carbón (100 mg) en etanol:agua (90:10 en volumen) (30 ml). Se filtró el catalizador, y se evaporó

MORENO
MAN
13
ADRID
Teléf.

el filtrado a presión reducida proporcionando el compuesto del título en forma de una espuma blanca, 473 mg, 74%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 1,26-1,77 (m, 10H), 1,78-2,46 (m, 11H), 2,49-2,70 (m, 2H), 2,95-3,36 (m, 4H), 6,92-7,38 (m, 5H). Anal. Encont. C 64,05, H 7,73, N 6,22. $C_{24}H_{34}N_2O_4 \cdot 0,75H_2O$ requiere C 65,88, H 7,83, N 6,40%.

## Ejemplo 3

**Acido (+)-2-{[1-({[2-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1H-inden-2-il]amino}carbonil)ciclopentil]metil}-4-fenilbutanoico (F59).**



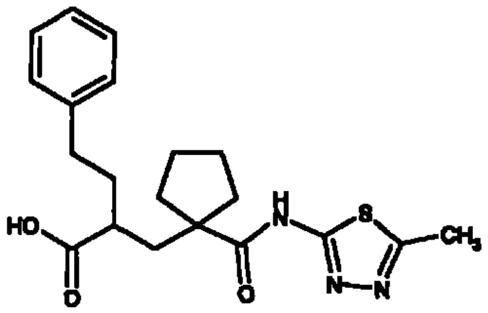
El ácido 2-{[1-({[2-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1H-inden-2-il]amino}carbonil)ciclopentil]metil}-4-fenilbutanoico (documento WO 9110644) puede purificarse por procedimientos estándar de HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) utilizando una columna AD y hexano:isopropanol:ácido trifluoroacético (70:30:0,2) como eluyente, proporcionando el compuesto del título del ejemplo 3, 99,5% ee, $[\alpha]_D=$

MORENO
AN
113
MADRID
Telef.

+9,1° (c= 1,76 en etanol).

**Ejemplo 4**

**Acido 2-[(1-{[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino]carbonil}ciclopentil)metil]-4-fenilbutanoico (F60).**



Se hidrogenó a 414 kPa durante 18 horas una mezcla del éster bencílico de la preparación 4 (4/70) (187 mg, 0,39 mmol) y paladio al 10% sobre carbón (80 mg) en etanol (20 ml). El análisis por TLC (Cromatografía en capa fina) mostró que quedaba material de partida, de modo que se añadió más paladio al 10% sobre carbón (100 mg) y la reacción continuó durante otras 5 horas. Los análisis de TLC mostraron de nuevo que quedaba material de partida, de modo que se añadió más catalizador (100 mg) y continuó la hidrogenación durante 18 horas. Se filtró la mezcla a través de Arbocel$^{(R)}$, se concentró el filtrado a presión

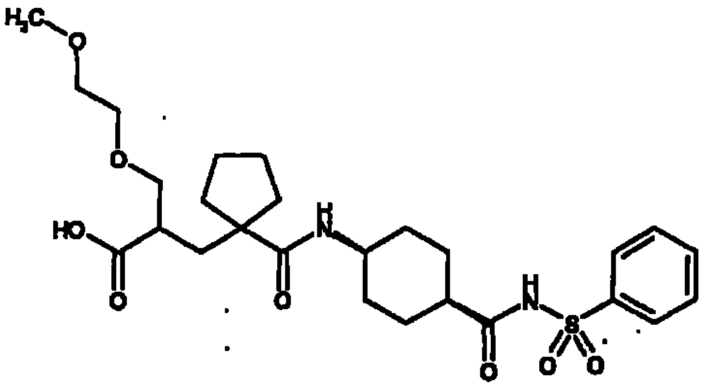
MORENO
AN
113
MADRID
Teléf.

1597

reducida y se destiló azeotrópicamente con diclorometano. Se purificó el producto en bruto por cromatografía sobre gel de sílice utilizando una columna Biotage(R) y diclorometano:metanol (95:5) como eluyente proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite transparente, 80 mg, 53%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 1,51-1,89 (m, 9H), 2,03 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 2,40 (m, 2H), 2,60 (m, 5H), 7,15-7,30 (m, 5H). LRMS (Espectrometría de masas de baja resolución): m/z 387,8 ($MH^+$).

## Ejemplo 5

## Acido cis-3-(2-metoxietoxi)-2-[(1-{[(4-{[(fenilsulfonil)amino]carbonil}ciclohexil)amino]-carbonil}ciclopentil)metil]propanoico (F61).



Se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas una disolución del éster terc-butílico de la preparación 8 (8/66) (446 mg, 0,75 mmol) en diclorometano (5 ml) y ácido

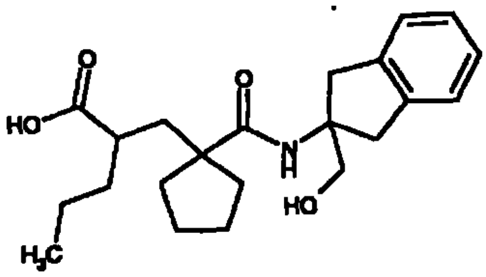
... MORENO
... MAN
... 113
... MADRID
Teléf. ...

1898

trifluoroacético (5 ml). Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se destiló azeotrópicamente el residuo con diclorometano, luego tolueno y finalmente éter, proporcionando el compuesto del título en forma de una espuma blanca, 385 mg, 95%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) $\delta$: 1,48-2,17 (m, 18H), 2,40 (s, 1H), 2,66 (s, 1H), 3,37 (s, 3H), 3,50-3,70 (m, 6H), 3,94 (s, 1H), 6,10 (d, 1H), 6,59 (s, 1H), 7,55 (t, 2H), 7,61 (m, 1H), 8,02 (d, 2H), 9,11 (s, 1H). Anal. encontr.: C 54,88, H 6,90, N 5,04. $C_{26}H_{38}N_2O_8S.1,7H_2O$ requiere C 57,97, H 7,11, N 5,20%.

## Ejemplo 6

## Acido (+)-2-{[1-({[2-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1H-inden-2-il]amino}carbonil)ciclopentil]metil}pentanoico (F62).



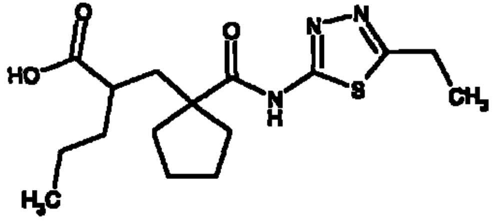
Se purificó adicionalmente ácido 2-{[1-({[2-hidroximetil)-2,3-dihidro-1H-inden-2-il]amino}carbonil)ciclopentil]metil} pentanoico (documento WO 9110644) por HPLC utilizando una columna AD y hexano:isopropanol:ácido trifluoroacético (90:10:0,1) como eluyente, proporcionando el compuesto del

MORENO
MADRID

título del ejemplo 6, 99% ee, $[\alpha]_D$= +10,4° (c= 0,067, etanol).

**Ejemplo 7**

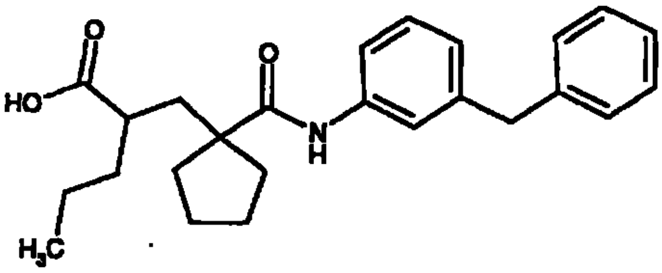
**Acido (+)-2-[(1-{[(5-etil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino]carbonil}ciclopentil)metil]pentanoico (F63).**



Se purificó adicionalmente el ácido de la preparación 18 (18/ej4) (824 mg) por HPLC utilizando una columna AD y utilizando hexano:isopropanol:ácido trifluoroacético (85:15:0,2) como eluyente, proporcionando el compuesto del título del ejemplo 7 en forma de una espuma blanca, 386 mg, 99% ee. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) $\delta$: 0,90 (t, 3H), 1,38 (m, 6H), 1,50-1,79 (m, 9H), 2,19 (m, 1H), 2,30 (m, 1H), 2,44 (m, 1H), 2,60 (m, 1H), 2,98 (q, 2H), 12,10-12,27 (s ancho, 1H). LRMS: m/z 338 ($MH^-$), y $[\alpha]_D$= +3,8° (c= 0,1, metanol).

**Ejemplo 8**

### Acido 2-({1-[(3-bencilanilino)carbonil]ciclopentil}-metil)pentanoico (F64).

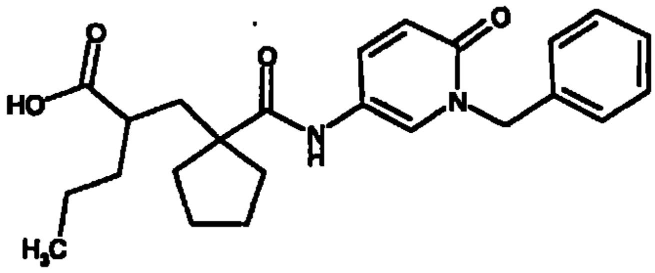


Se hidrogenó a 207 kPa y temperatura ambiente durante 2 horas una mezcla de éster bencílico de la preparación 10 (10/53) (1,3 mg, 2,47 mmol) y paladio al 5% sobre carbón (130 mg) en agua (10 ml) y etanol (40 ml). Se filtró la mezcla de reacción a través de Arbocel$^{(R)}$, se concentró el filtrado a presión reducida y se trituró el residuo con diclorometano. Se trituró la goma residual con éter, y después con hexano y se secó a 50°C proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido, 0,79 g, 81%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta$: 0,95 (t, 3H), 1,24-1,51 (m, 3H), 1,58-1,80 (m, 7H), 1,88 (dd, 1H), 2,15 (m, 2H), 2,24 (m, 1H), 2,48 (m, 1H), 4,00 (s, 2H), 6,98 (d, 1H), 7,24 (m, 6H), 7,40 (m, 3H). Anal. Encont. C 75,48, H 7,76, N 3,59. $C_{25}H_{31}NO_3 \cdot 0,25H_2O$ requiere C 75,44, H 7,98, N 3,51%.

MORENO
AN
RID

**Ejemplo 9**

**Acido 2-[(1-{[(1-bencil-6-oxo-1,6-dihidro-3-piridinil)amino]carbonil}ciclopentil)metil]pentanoico (F65).**



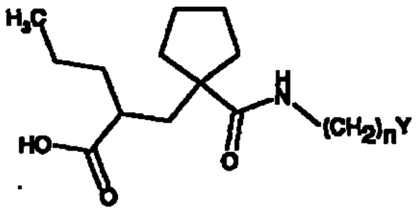
Se obtuvo el compuesto del título en forma de una espuma blanca con un 51% de rendimiento a partir del éster bencílico de la preparación 13 (13/56) siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 19 (19/ej21) excepto porque el producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo como eluyente. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta$: 0,96 (t, 3H), 1,28-1,80 (m, 12H), 2,01 (m, 1H), 2,30-2,52 (m, 2H), 5,02 (dd, 2H), 6,60 (d, 1H), 7,27 (m, 5H), 7,70 (s, 1H), 8,34 (s, 1H). Anal. Encont. C 69,52, H 7,41, N 6,51. $C_{24}H_{30}N_2O_4 \cdot 0,25H_2O$ requiere C 69,45, H 7,41, N 6,75%.

**Ejemplo 10**

**Acido 2-{[1-({[(1R,3S,4R)-4-(aminocarbonil)-3-butilciclohexil]amino}carbonil)ciclopentil]metil}pentanoico**

PATRICIA ... MORENO
... MAN
... 113
... ADRID
Telé..

(F66).

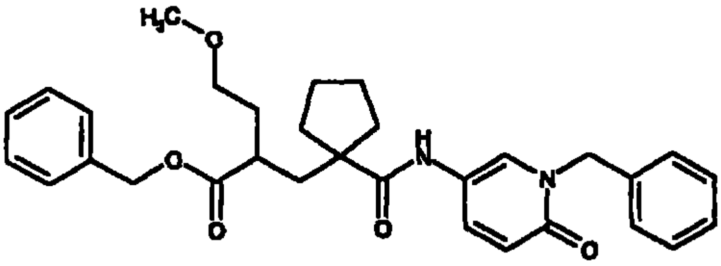


(Ic)

Los compuestos de fórmula ic, es decir, compuestos de fórmula general i en la que r$^1$ es propilo, se prepararon a partir del correspondiente éster terc-butílico, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 14 (14/ej1).

## Preparación 1 (1/62)

## 2-[(1-{[(1-Bencil-6-oxo-1,6-dihidro-3-piridinil)amino]carbonil}ciclopentil)metil]-4-metoxibutanoato de bencilo



Se añadió cloruro de oxalilo (0,26 ml, 3,0 mmol) a una disolución enfriada con hielo de ácido 1-{2-[(benciloxi)carbonil]-4-metoxibutil}ciclopentanocarboxílico

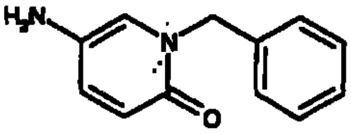
MORENO
RID

(documento EP 274234) (1,0 g, 3,0 mmol) y N,N-dimetilformamida (2 gotas) en diclorometano (20 ml) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se concentró la disolución a presión reducida y se destiló azeotrópicamente el residuo con diclorometano (3 x 10 ml). Se disolvió el producto en diclorometano (20 ml), después se enfrió en baño de hielo. Se añadieron la amina de la preparación 2 (2/28) (600 mg, 3 mmol) y N-metilmorfolina (0,6 ml, 5,45 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se repartió entre agua y éter. Se lavó la capa orgánica con ácido clorhídrico (2 N), disolución de bicarbonato de sodio y después agua, se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida. Se purificó el sólido verde residual por cromatografía de columna de presión media sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo:hexano (90:10) como eluyente, proporcionando el compuesto del título, 880 mg, 57%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta$: 1,37-2,28 (m, 12H), 2,46-2,64 (m, 1H), 3,20 (s, 3H), 3,31 (m, 2H), 4,97 (dd, 2H), 5,08 (dd, 2H), 6,57 (d, 1H), 7,12 (m, 1H), 7,18-7,48 (m, 10H), 8,08 (d, 1H).

## Preparación 2 (2/28)

## 5-Amino-1-bencil-2(1H)piridinona

PATRICIA ... MORENO
...AN
...RID

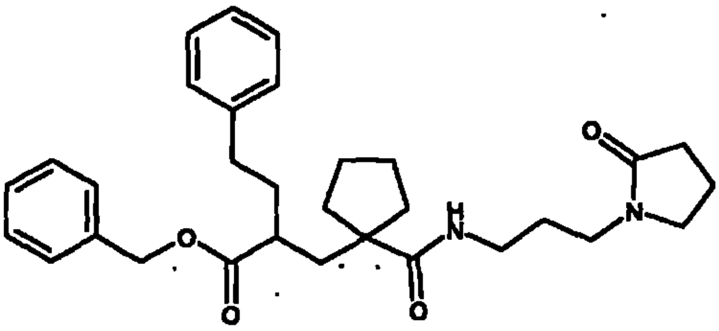


Se calentó a 90°C durante 1,5 horas una mezcla de 1-bencil-5-nitro-1H-piridin-2-ona (Justus Liebig Ann. Chem. 484, 1930, 52) (1,0 g, 4,35 mmol) y estaño granulado (3,5 g, 29,5 mmol) en ácido clorhídrico concentrado (14 ml). Se diluyó con agua la disolución enfriada se neutralizó utilizando una disolución de carbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (250 ml en total). Se filtraron los extractos orgánicos combinados, se secaron ($MgSO_4$) y se evaporaron a presión reducida proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido verde pálido (que se vuelve azul con el tiempo), 440 mg, 51%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 250 MHz) $\delta$: 4,12-4,47 (s ancho, 2H), 5,00 (s, 2H), 6,31 (d, 1H), 6,86 (s, 1H), 7,07 (m, 1H), 7,14-7,42 (m, 5H).

## Preparación 3 (3/67)

## 2-{[1-({[3-(2-Oxo-1-pirrolidinil)propil]amino}-carbonilciclopentil]metil}-4-fenilbutanoato de bencilo

PATRICIA ... MORENO
... MADRID



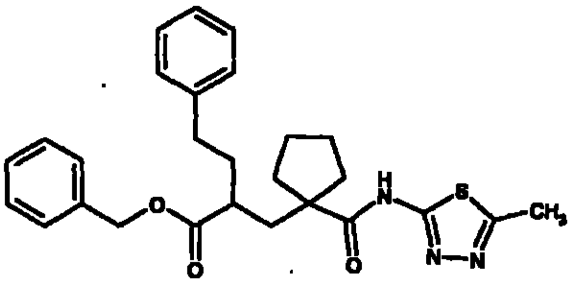
Se añadieron secuencialmente clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,06 g, 5,53 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,60 g, 4,44 mmol) y 4-metilmorfolina (0,56 g, 5,54 mmol) a una disolución enfriada de ácido 1-{2-[(benciloxi)carbonil]-4-fenilbutil}ciclopentanocarboxílico (documento EP 274234) (1,5 g, 3,94 mmol) en diclorometano seco (15 ml) a temperatura ambiente, seguido de N-(3-aminopropil)-2-pirrolidinona (0,56 g, 3,94 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. Se lavó la mezcla con agua, ácido clorhídrico 2 N y disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y después se secó ($MgSO_4$) y evaporó a presión reducida. Se purificó el aceite amarillo residual por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo:pentano (50:50) como eluyente, proporcionando el compuesto del título en forma de una goma transparente, 800 mg, 40%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta$: 1,37-2,20 (m, 16H), 2,34-2,58 (m, 5H), 2,92-3,46

MORENO
MAN
113
ADRID

(m, 6H), 5,07 (d, 1H), 5,18 (d, 1H), 6,98-7,47 (m, 10H).

**Preparación 4 (4/70)**

**2-[(1-{[(5-Metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino]carbonil}ciclopentil)-metil]-4-fenilbutanoato de bencilo**



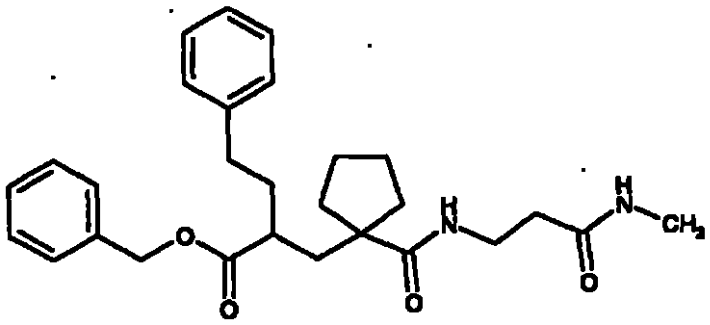
Se obtuvo el compuesto del título en forma de un aceite transparente con un rendimiento del 74% a partir de ácido 1-{2-[(benciloxi)carbonil]-4-fenilbutil}-ciclopentanocarboxílico (documento EP 274234) y 2-amino-5-metil-1,3,4-tiadiazol, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 5 (5/68). RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 400 MHz) $\delta$: 1,58-1,76 (m, 7H), 1,83-1,98 (m, 3H), 2,03 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 2,35 (m, 1H), 2,44 (m, 3H), 2,65 (s, 3H), 5,02 (dd, 2H), 7,00 (d, 2H), 7,15 (m, 1H), 7,19 (m, 2H), 7,35 (m, 5H). LRMS: m/z 478,7 (MH$^+$).

**Preparación 5 (5/68)**

**2-{[1-({[3-(metilamino)-3-oxopropil]amino}-**

PATENTES ... MORENO
ING ... JUAN
... n° 113
... MADRID
Tel...

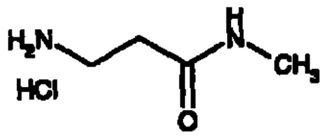
carbonil)ciclopentil]metil}-4-fenilbutanoato de bencilo



Se añadieron secuencialmente clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (122 mg, 0,64 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (86 mg, 0,64 mmol) y 4-metilmorfolina (173 µl, 1,59 mmol) a una disolución enfriada de ácido 1-{2-[(benciloxi)carbonil]-4-fenilbutil}ciclopentanocarboxílico (documento EP 274234) (202 mg, 0,53 mmol) en N,N-dimetilformamida (5 ml) a temperatura ambiente, seguido del clorhidrato de amina de la preparación 6 (6/23) (146 mg, 1,06 mmol) y se agitó la reacción a 90°C durante 18 horas. Se concentró la disolución enfriada a presión reducida y se repartió el residuo entre agua (20 ml) y acetato de etilo (100 ml). Se separaron las capas, se lavó la fase orgánica con agua (3 x 30 ml) y salmuera (25 ml), se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida proporcionando un aceite transparente. Se purificó el producto en bruto por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando diclorometano:metanol (98:2) como eluyente, proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite incoloro, 162 mg, 67%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) $\delta$: 1,38-1,53 (m, 2H), 1,53-1,96 (m, 8H), 2,02 (m, 2H), 2,27 (t, 2H), 2,46 (m, 3H), 2,76 (d, 3H), 3,44 (m, 2H), 5,13 (s, 2H), 5,79 (s ancho, 1H), 6,38 (m, 1H), 7,06 (d, 2H), 7,18 (m, 1H), 7,22 (m, 2H), 7,38 (m, 5H). LRMS: m/z 465,5 ($MH^+$).

## Preparación 6 (6/23)

## Clorhidrato de 3-amino-N-metilpropanamida

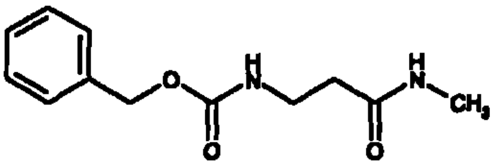


Se hidrogenó a 345 kPa y temperatura ambiente durante 4 horas una mezcla del carbamato de bencilo de la preparación 7 (7/13) (7,92 g, 33,5 mmol) y paladio al 5% sobre carbón (800 mg) en etanol (300 ml). Se filtró la mezcla de reacción a través de Arbocel$^{(R)}$, se lavó con etanol y se añadió ácido clorhídrico 1 N (36,9 ml, 36,9 mmol) al filtrado combinado. Se evaporó esta disolución a presión reducida y se destiló azeotrópicamente el residuo con diclorometano, proporcionando el compuesto del título en forma de una espuma incolora, 4,66 g. RMN-$^1$H (DMSO-$d_6$, 300 MHz) $\delta$: 2,46 (t, 2H), 2,60 (s, 3H), 2,95 (m, 2H), 7,98-8,16 (m, 2H).

MORENO
RID

## Preparación 7 (7/13)

## 3-(Metilamino)-3-oxopropilcarbamato de bencilo

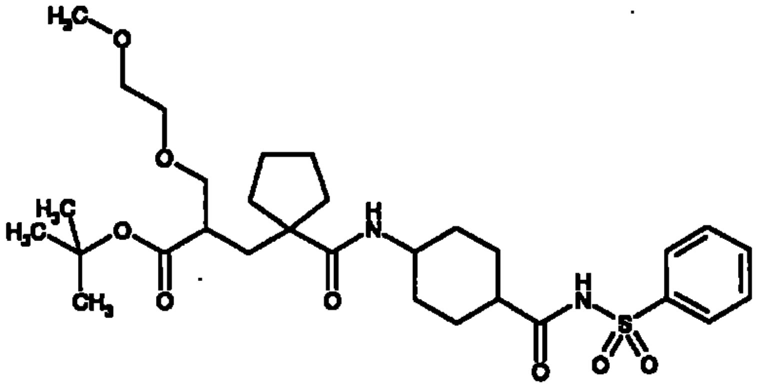


Se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas una mezcla de N-[(benciloxi)carbonil]-$\beta$-alanina (10 g, 44,8 mmol), clorhidrato de metilamina (3,33 g, 49,28 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (6,05 g, 44,8 mmol), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (10,3 g, 53,76 mmol) y N-metilmorfolina (11,33 ml, 103 mmol) en diclorometano (200 ml). Se filtró el precipitado resultante proporcionando el producto deseado en forma de una espuma incolora y se evaporó el filtrado a presión reducida. Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando un gradiente de elución de acetato de etilo:hexano (90:10 a 100:0) proporcionando producto adicional, 7,96 g, 75% en total. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta$: 2,42 (t, 2H), 2,80 (s, 3H), 3,50 (m, 2H), 5,21 (s, 2H), 5,49 (s ancho, 1H), 5,63 (s ancho, 1H), 7,36 (m, 5H). Anal. Encont.: C 60,68, H 7,00, N 11,95. $C_{12}H_{16}N_2O_3$ requiere C 61,00, H 6,83, N 11,86%.

## Preparación 8 (8/66)

PATRICIA NOGUE MORENO
MADRID

## 3-(2-Metoxietoxi)-2-[(1-{[(4-{[(fenilsulfonil)-amino]carbonil}-ciclohexil)amino]carbonil}-cilopentil)metil]propanoato de cis-terc-butilo



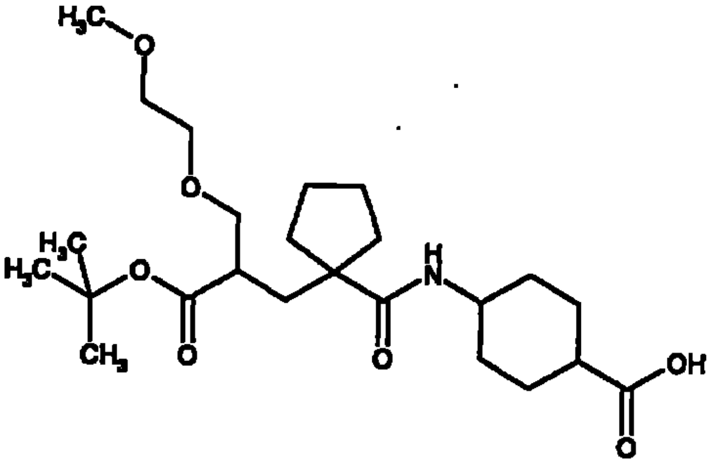
Se añadieron N,N'-diciclohexilcarbodiimida (199 mg, 0,97 mmol), 4-dimetilaminopiridina (118 mg, 0,97 mmol) y bencenosulfonamida (152 mg, 0,97 mmol) a una disolución enfriada con hielo del ácido de la preparación 9 (9/63) (400 mg, 0,878 mmol) en diclorometano (12 ml) y N,N-dimetilformamida (0,5 ml) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 20 horas. Se concentró la mezcla a presión reducida y se suspendió el residuo en acetato de etilo frío. Se filtró el material insoluble resultante, se lavó el filtrado con ácido clorhídrico (1 N) y agua, después se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida. Se purificó el producto en bruto por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando un gradiente de elución de diclorometano:metanol (95:5 a 90:10) proporcionando el compuesto del título en forma de

PATRICIA
MORENO
MADRID

una espuma blanca, 480 mg, 92%. RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 400 MHz) δ: 1,44 (s, 9H), 1,63 (m, 13H), 1,80 (m, 2H), 1,88 (m, 1H), 1,98 (m, 2H), 2,36 (m, 1H), 2,57 (m, 1H), 3,38 (s, 3H), 3,40 (m ,1H), 3,51 (t, 2H), 3,58 (m, 3H), 3,95 (m, 1H), 5,92 (d, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,62 (m, 1H), 8,05 (d, 2H), 8,75 (s ancho, 1H). LRMS: m/z 618 (MNa$^+$).

## Preparación 9 (9/63)

**Acido 4-{[(1-{3-terc-Butoxi-2-[(2-metoxietoxi)metil]-3-oxopropil}ciclopentil)carbonil]amino}ciclohexanocarboxílico**



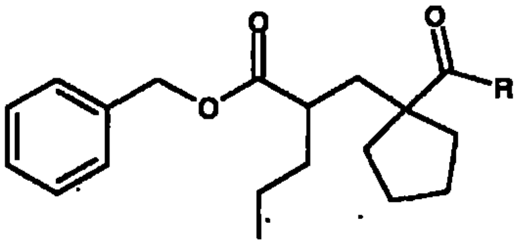
Se hidrogenó a 345 kPa a temperatura ambiente durante 18 horas una mezcla de 4-{[(1-{3-terc-butoxi-2-[(2-metoxietoxi)metil]-3-oxopropil}ciclopentil)carbonil]amino} ciclohexanocarboxilato de bencilo (documento EP 274234) y paladio al 10% sobre carbón (250 mg) en agua (10 ml) y etanol (50 ml). Se filtró la mezcla de reacción a través

PATRICIA [illegible] MORENO
MADRID

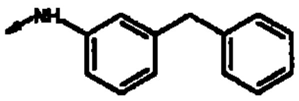
de Solkafloc$^{(R)}$, se concentró el filtrado a presión reducida y se destiló azeotrópicamente el residuo con tolueno (3x) y después con diclorometano (3x) proporcionando el compuesto del título, 2,0 g, 96%. RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 300 MHz) δ: 1,48 (s, 9H), 1,53-1,84 (m, 14H), 1,94-2,10 (m, 5H), 2,60 (m, 2H), 3,40 (s, 3H), 3,41-3,63 (m, 5H), 3,96 (m, 1H), 5,90 (d ancho, 1H).

## Preparación 10 (10/53)

El siguiente compuesto



en el que:

| Prep. | R | Rendim. (%) | Datos |
|---|---|---|---|
| 10 (10/53)$^1$ |  | 90 | RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 300 MHz) δ: 0,84 (t, 3H), 1,24 (m, 2H), 1,40-1,76 (m, 7H), 1,84 (dd, 1H), 1,98 (m, 1H), 2,19 (dd, 1H), 2,28 (m, 1H), 2,56 (m, 1H), 3,98 (s, 2H), 4,99 (dd, 2H), 6,98 (d, 1H), 7,19-7,42 (m, 15H). |

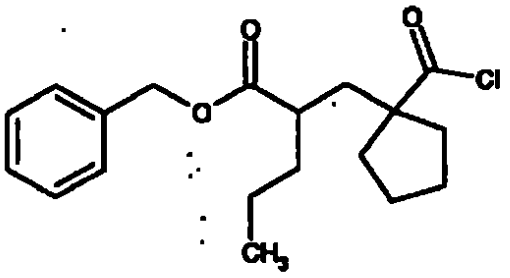
1= diclorometano utilizado como eluyente de la columna

PATRICIA NOGES MORENO
INGLES Y ALEMAN
113
MADRID

se preparó a partir del cloruro de ácido de la preparación 11 (11/3) y la amina apropiada, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 12 (12/52).

### Preparación 11 (11/3)

### 2-{[1-(Clorocarbonil)ciclopenil]metil}pentanoato de bencilo

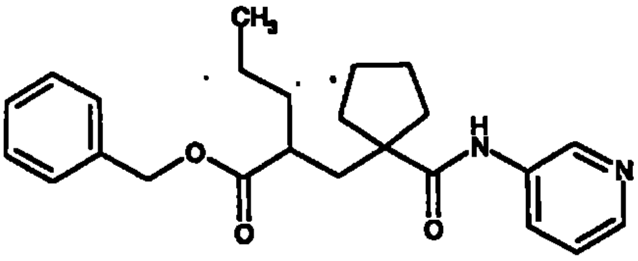


Se añadió cloruro de oxalilo (1,15 ml, 13,2 mmol) a una disolución enfriada en hielo de ácido 1-{2-[(benciloxi)carbonil]pentil}ciclopentanocarboxílico (documento EP 274234) (2,0 g, 6,3 mmol) en diclorometano seco (20 ml) y se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 2 horas. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se destiló azeotrópicamente el residuo con diclorometano (3x) proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite dorado, 2,1 g. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta$: 0,88 (t, 3H), 1,28 (m, 2H), 1,43 (m, 2H), 1,63 (m, 6H), 2,00 (m, 1H), 2,08-2,35 (m, 3H), 2,44 (m, 1H), 5,15 (s, 2H), 7,28 (m, 5H).

PATRICIA KOCH MORENO

## Preparación 12 (12/52)

## 2-({1-[(3-Piridinilamino)carbonil]ciclopentil} metil)pentanoato de bencilo



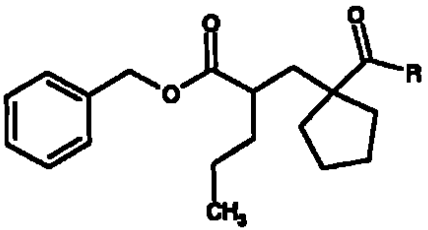
Se añadió trietilamina (0,11 ml, 0,78 mmol) a una mezcla del cloruro de ácido de la preparación 11 (11/3) (200 mg, 0,60 mmol) y 2-aminopiridina (61 mg, 0,65 mmol) en diclorometano (3 ml) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se evaporó la mezcla a presión reducida, se repartió el residuo entre disolución de bicarbonato de sodio (5 ml) y acetato de etilo (20 ml) y se separaron las capas. Se secó la fase orgánica ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida proporcionando una goma. Se purificó el producto en bruto por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo como eluyente, proporcionando el compuesto del título, 130 mg. RMN-$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz) $\delta$: 0,82 (t, 3H), 1,21 (m, 3H), 1,40 (m, 1H), 1,43-1,72 (m, 6H), 1,81 (d, 1H), 1,98 (m, 1H), 2,18 (m, 1H), 2,24 (m, 1H), 2,46 (m, 1H), 4,98 (m, 2H), 7,20-7,38 (m, 6H), 7,42 (s, 1H), 8,06 (d, 1H), 8,35 (d,

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

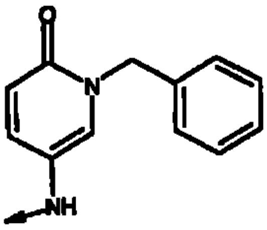
1H), 8,56 (s, 1H).

**Preparación 13 (13/56)**

El siguiente producto:



en el que

| Prep. | R | Rendim. (%) | Datos |
|---|---|---|---|
| 13 (13/56)[2] |  | 53 | RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 0,84 (t, 3H), 1,25 (m, 2H), 1,27-1,99 (m, 10H), 2,07-2,30 (m, 2H), 2,47 (m, 1H), 4,99 (s, 2H), 5,10 (dd, 2H), 6,59 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,34 (m, 11H), 8,10 (s, 1H). |

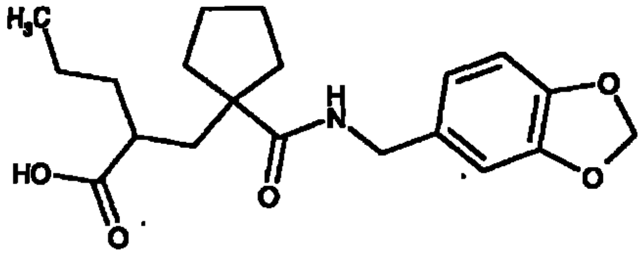
2= N-metilmorfolina utilizada como base

se preparó a partir del cloruro de ácido de la preparación 11 (11/3) y la amina apropiada, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 12 (12/52).

**Preparación 14 (14/ej1)**

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] RID

## Acido 2-({1-[1,3-benzodioxol-5-ilamino)carbonil]-ciclopentil}metil)pentanoico

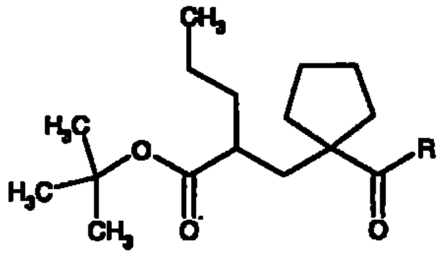


Se añadió ácido trifluoroacético (5 ml) a una disolución de éster terc-butílico de la preparación 15 (15/34) (130 mg, 0,31 mmol) en diclorometano (5 ml), y se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 4 horas. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se destiló azeotrópicamente el residuo con tolueno y diclorometano proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite transparente, 112 mg. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 0,83 (t, 3H), 1,22-1,40 (m, 3H), 1,50-1,72 (m, 8H), 1,95 (m, 1H), 2,10 (m, 2H), 2,19 (m, 1H), 4,30 (m, 2H), 5,93 (s, 2H), 5,99 (s ancho, 1H), 6,74 (m, 3H). LRMS: m/z 380 ($MH^-$).

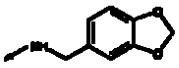
**Preparación 15 (15/34)**

El siguiente compuesto:

PATENT... MORENO
ING ... AN
... 113
... MADRID
Telé...



en el que

| Prep. | R | Amina de partida | Rend. (%) | Datos |
|---|---|---|---|---|
| 15 (15/34) |  | piperonilamina | 88 | RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 400 MHz) δ: 0,85 (t, 3H), 1,26 (m, 4H), 1,42 (s, 9H), 1,46 (m, 2H), 1,59-1,75 (m, 5H), 1,95 (m, 2H), 2,06 (m, 1H), 2,22 (m, 1H), 4,26 (dd, 1H), 4,39 (dd, 1H), 5,95 (m, 3H), 6,78 (m, 3H). LRMS: m/z 418,3 (MH$^+$) |

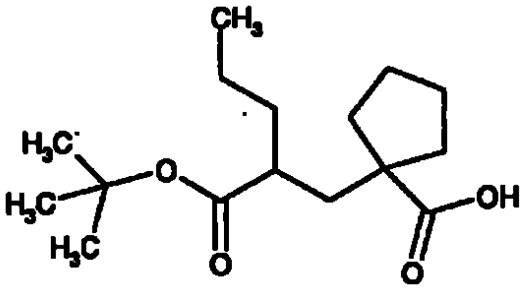
se preparó a partir del ácido de la preparación 16 (16/1) y el compuesto amina apropiado, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 17 (17/33).

## Preparación 16 (16/1)

## Acido 1-[2-(terc-butilcarbonil)-4-pentil]ciclopentanocarboxílico

PATRICIA KOCH MORENO
ING ... 113
... MADRID
Tel.

1918

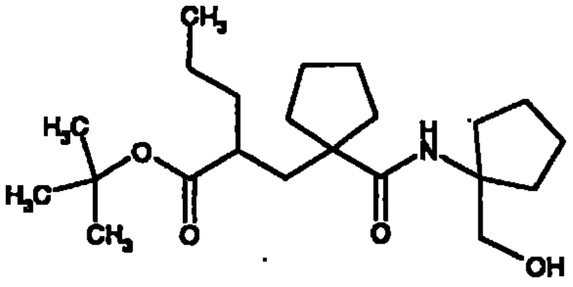


Se hidrogenó a 207 kPa a temperatura ambiente durante 18 horas una mezcla de ácido 1-[2-(terc-butoxicarbonil)-4-pentenil]ciclopentanocarboxílico (documento EP 274234) (23 g, 81,5 mmol) y paladio al 10% sobre carbón (2 g) en etanol seco (200 ml). Se filtró la mezcla de reacción a través de Arbocel$^{(R)}$ y se evaporó el filtrado a presión reducida proporcionando un aceite amarillo. Se purificó el producto en bruto por cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando acetato de etilo:pentano (40:60) como eluyente, proporcionando el producto deseado en forma de un aceite transparente, 21 g, 91%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$) 0,86 (t, 3H), 1,22-1,58 (m, 15H), 1,64 (m, 4H), 1,78 (dd, 1H), 2,00-2,18 (m, 3H), 2,24 (m, 1H). LRMS: m/z 283 $(M-H)^-$.

**Preparación 17 (17/33)**

**2-{[1-({[1-(hidroximetil)ciclopentil]amino}carbonil)-ciclopentil]metil}pentanoato de terc-butilo .**

MORENO
113
MADRID
Tel.



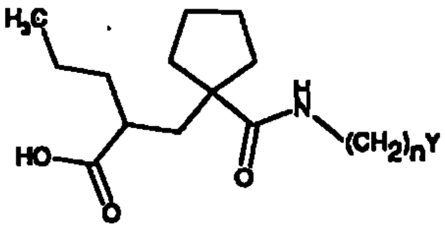
Se añadieron clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (41 mg, 0,21 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (27 mg, 0,2 mmol), N-metilmorfolina (35 µl, 0,31 mmol) y finalmente 1-amino-1-ciclopentanometanol (25 mg, 0,22 mmol) a una disolución del ácido de la preparación 16 (16/1) (150 mg, 0,53 mmol) en N,N-dimetilformamida (3 ml) y se agitó la reacción a 90°C durante 18 horas. Se diluyó la disolución enfriada con acetato de etilo (90 ml), se lavó con agua (3 x 25 ml) y salmuera (25 ml) y después se secó ($MgSO_4$) y evaporó a presión reducida. Se purificó el producto en bruto por cromatografía sobre gel de sílice, utilizando acetato de etilo:pentano (30:70) como eluyente para proporcionar el compuesto del título, 38 mg, 57%. RMN-$^1H$ ($CDCl_3$, 400 MHz) $\delta$: 0,88 (t, 3H), 1,29 (m, 3H), 1,41-1,78 (m, 26H), 1,78-1,98 (m, 4H), 2,04 (m, 1H), 2,26 (m, 1H), 3,59 (dd, 1H), 3,70 (dd, 1H), 4,80 (t, 1H), 5,81 (s, 1H). LRMS: m/z 380 $(MH)^-$.

[illegible] MORENO
[illegible]AN
[illegible] 113
[illegible]ADRID

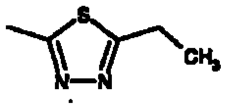
1920

**Preparación 18 (18/ej4)**

Se preparó un compuesto de fórmula la mostrada a continuación a partir del correspondiente éster terc-butílico siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 14 (14/ej1).



(Ic)

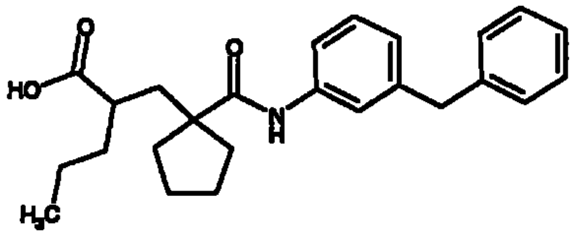
| Ej. | N | R | Rendim. (%) | Datos |
|---|---|---|---|---|
| 18 (18/ej4)[3] | 0 |  | 86 | RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 400 MHz) δ: 0,92 (t, 3H), 1,35 (t, 3H), 1,25-1,80 (m, 11H), 2,20-2,50 (m, 4H), 2,95 (q, 2H), 12,10 (s ancho, 1H).<br>LRMS: m/z 339,8 (MH$^+$).<br>Anal. Encont. C 56,46, H 7,46, N 12,36. $C_{16}H_{25}N_3O_3S$ requiere C 56,62, H 7,44, N 12,37% |

3= recristalizado con éter

**Preparación 19 (19/ej21)**

PATRICIA [illegible] MORENO
MADRID

### Acido 2-({1-[(3-bencilanilino)carbonil]-ciclopentil}metil)pentanoico



Se hidrogenó a 207 kPa a temperatura ambiente durante 2 horas una mezcla de éster bencílico de la preparación 10 (10/53) (1,3 mg, 2,47 mmol) y paladio al 5% sobre carbón (130 mg) en agua (10 ml) y etanol (40 ml). Se filtró la mezcla de reacción a través de Arbocel$^{(R)}$, se concentró el precipitado a presión reducida y se trituró el residuo con diclorometano. Se trituró la goma residual con éter, después con hexano, y se secó a 50°C proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido, 0,79 g, 81%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta$: 0,95 (t, 3H), 1,24-1,51 (m, 3H), 1,58-1,80 (m, 7H), 1,88 (dd, 1H), 2,15 (m, 2H), 2,24 (m, 1H), 2,48 (m, 1H), 4,00 (s, 2H), 6,98 (d, 1H), 7,24 (m, 6H), 7,40 (m, 3H). Anal. Encont. C 75,48, H 7,76, N 3,59. $C_{25}H_{31}NO_3 \cdot 0,25H_2O$ requiere C 75,44, H 7,98, N 3,51%

## ENSAYO ACE

PREPARACION Y ENSAYO DE ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

PATRICIA KOCH MORENO
... MADRID

## SOLUBLE (ACE) A PARTIR DE CORTEZA RENAL PORCINA Y HUMANA

La actividad ACE soluble se obtiene a partir de la corteza renal y se ensaya por medición de la tasa de corte del sustrato de ACE Abz-Gly-para-nitro-Phe-Pro-OH para generar el producto fluorescente, Abz-Gly.

### 1. MATERIALES

Toda el agua está doblemente desionizada.

| | |
|---|---|
| 1.1 Riñón humano | IIAM (Pennsylvania, EE.UU.) o Human Tissue Bank del Reino Unido (UK HTB) |
| 1.2 ACE renal porcina | Sigma (A2580) |

1.3 Tampón de homogeneización 1

Manitol 100 mM y Tris 20 mM a pH 7,1

Se diluyen 2,42 g de Tris (Fisher T/P630/60) en 1 litro de agua y se ajusta el pH a 7,1 utilizando HCl 6 M a temperatura ambiente. Se añade a ésto 18,22 g de manitol (Sigma M-9546).

1.4 Tampón de homogeneización 2

Manitol 100 mM y Tris 20 mM a pH 7,1 y $MgCl_2.6H_2O$ 10 mM (Fisher M0600/53)

Se añaden a 500 ml del tampón de homogeneización 1 (1.4) 1,017 g de $MgCl_2$.

113
MADRID
Teléf.

1.5 Tampón Tris (tampón ACE)

Tris 50 mM y NaCl 300 mM a pH 7,4

Se preparan 50 ml de Tris 50 mM pH 7,4 (Sigma T2663) y 17,52 g de NaCl (Fisher S/3160/60) en agua hasta un volumen de 1000 ml.

1.6 Sustrato (Abz-D-Gly-para-nitro-Phe-Pro-OH) (Bachem M-1100)

Se almacena el sustrato ACE en forma de polvo a -20°C. Se prepara una disolución madre 2 mM por resuspensión suave del sustrato en tampón ACE, no debe agitarse en Vortex ni sonicarse. Se almacenan alícuotas de 400 µl de disolución madre 2 mM a -20°C durante un periodo de hasta un mes.

1.7 Producto total

Se incluyen en la placa muestras correspondientes al 100% de conversión de producto a sustrato para posibilitar la determinación del % de rendimiento del sustrato (véanse cálculos). Se genera el producto total por incubación de 1 ml de sustrato 2 mM con 20 µl de disolución madre de enzima durante 24 horas a 37°C.

1.8 Disolución de parada.

Se diluye EDTA 0,5 M (Promega CAS [6081/92/6] 1:250 en tampón ACE para preparar una disolución 2 mM.

1.9 Dimetilsulfóxido (DMSO)

1.10 Cloruro de magnesio, $MgCl_2.6H_2O$ (Fisher M0600/53)

1.11 Placas de ensayo de fondo plano de 96 pocillos negras

PAT... MORENO
...MAN
..., 113
...MADRID
Telf...

(Costar 3915 o Packard).

1.12 Topseal A (Packard 6005185).

1.13 Tubos de centrífuga

## 2. EQUIPAMIENTO ESPECIFICO

2.1 Centrífuga Sorvall RC-5B (rotor SS34 GSA, preenfriada a 4°C).

2.2 mezclador Miniprimer de Braun

2.3 Centrífuga Beckman CS-6R.

2.4 BMG Fluostar galaxy

2.5 Incubador de agitación Wesbart 1589.

## 3. PROCEDIMIENTOS

### 3.1 PREPARACION DE TEJIDOS

3.2 Se obtiene ACE humana de corteza renal utilizando un procedimiento adaptado de Booth, A.G. & Kenny, A.J. (1974) *Biochem J.*, 142, 575-581.

3.3 Se dejan descongelar los riñones congelados a temperatura ambiente y se extraen las cortezas de la médula.

3.4 Se corta finamente en láminas la corteza y se homogeneiza en aproximadamente 10 volúmenes de tampón de homogeneización 1 (1.4) utilizando un dispositivo

MORENO
113
MADRID
Telé.

Miniprimer de Braun (2.2).

3.5 Se añade cloruro de magnesio (1.1) (20,3 mg/g de tejido) al homogeneizado y se agita en baño de hielo y agua durante 15 minutos.

3.6 Se centrifuga el homogeneizado a 1.500 g (3.820 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman (2.3) antes de extraer el sobrenadante a un tubo de centrífuga nuevo y de descartar el sedimento.

3.7 Se centrifuga el sobrenadante a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Sorvall (2.1) y se descarta el sobrenadante.

3.8 Se extrae la capa rosa pálido de encima del sedimento restante y se resuspende en tampón de homogeneización 2 (1.5) (5 ml de tampón por 1 g de tejido).

3.9 Se centrifuga la suspensión a 2.200 g (4.630 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman antes de descartar el sedimento.

3.10 Se centrifuga el sobrenadante a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos utilizando la centrífuga Sorvall y se descarta el sobrenadante.

3.11 Se resuspende el sedimento final en tampón de homogeneización 2 (0,5 ml de tampón por 1 g de tejido). Se obtiene una suspensión homogénea utilizando Miniprimer de Braun. Esta se congela a continuación en alícuotas de 100 μl para ensayar la actividad NEP.

PAT... MORENO
ING... Y ...AN
... 113
... MADRID
Telé...

## 4.0 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ACE

Se mide la actividad de la ACE previamente dispuesta en alícuotas por su capacidad de cortar el sustrato peptídico específico de ACE.

Se descongela ACE porcina (1.2) y se resuspende en tampón ACE (1.6) a 0,004 U/μl, que se vuelve a congelar en alícuotas de 50 μl.

4.1 Se prepara una disolución de DMSO al 4%/tampón ACE (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón ACE).

4.2 Se dejan las disoluciones madre de sustrato (1.7), producto total (1.8) y enzima (1.1, 1.2 y 1.3) en hielo para descongelar.

4.3 Se añaden 50 μl de disolución de DMSO al 4%/tampón ACE a cada pocillo.

4.4 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:100 para preparar una disolución 20 μM. Se añaden 100 μl de sustrato 20 μM a cada pocillo (concentración final en el ensayo 10 μM).

4.5 Se añaden 50 μl de un intervalo de diluciones de enzimas para iniciar la reacción (habitualmente se utilizan 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200). Se añaden 50 μl de tampón ACE a los pocillos blanco.

4.6 Se diluye el producto total 2 mM 1:200 para preparar

PAT[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 3
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

una disolución 10 µM. Se añaden 200 µl de producto 10 µM a los cuatro primeros pocillos de una placa nueva.

4.7 Se incuban las placas a 37°C en incubador de agitación durante 60 minutos.

4.8 Se para la reacción por adición de 100 µl de EDTA 2 mM en tampón ACE y se incuba a 37°C en un incubador de agitación durante 20 minutos antes de leer en un BMG Fluostar Galaxy (ex320, em420).

## 5. ENSAYOS DE INHIBICION DE ACE

5.1 Se dejan las disoluciones madre de sustrato, producto total y enzima en hielo para descongelar.

5.2 Se preparan disoluciones madre del compuesto con DMSO al 100% y se diluyen 1:25 en tampón ACE proporcionando una disolución de DMSO al 4%. Todas las demás diluciones se llevan a cabo en disolución de DMSO al 4% tampón ACE (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón ACE).

5.3 Se añaden 50 µl de compuesto por duplicado a la placa de 96 pocillos y se añaden 50 µl de DMSO al 4%/tampón ACE a los pocillos de control y a los blancos.

5.4 Las etapas 5.2 y 5.3 pueden llevarse a cabo manualmente o utilizando robots multisonda de Packard.

5.5 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:100 en tampón ACE preparando una disolución 20 µM

[illegible] MORENO
[illegible] AN
INC [illegible]
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

(concentración final 10 µM en el ensayo) (110 µl de sustrato 2 mM añadidos a 10,89 ml de tampón es suficiente para una placa).

5.6 Se diluye la disolución madre de enzima en tampón ACE, según lo determinen las comprobaciones de actividad (4.0).

5.7 Se diluye la disolución madre de producto total 2 mM 1:200 en tampón ACE para preparar una disolución 10 µM. Se añaden 200 µl a los cuatro primeros pocillos de una placa por separado.

5.8 Se diluye la disolución madre de EDTA 0,5 mM 1:250 para preparar una disolución madre 2 mM (44 µl de EDTA a 10,96 ml de tampón ACE).

5.9 Se añade a cada pocillo de la placa de 96 pocillos los siguientes reactivos:

Tabla 1: Reactivos añadidos a la placa de 96 pocillos.

| | Compuest /DMSO | Tampón Tris | Sustrato | Enzima ACE | Producto total |
|---|---|---|---|---|---|
| Muestras | 2 µl de compuesto | 50 µl | 100 µl | 50 µl | Nada |
| Controles | 2 µl de DMSO | 50 µl | 100 µl | 50 µl | Nada |

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Blancos | 2 µl de DMSO | 100 µl | 100 µl | Nada | Nada |
| Totales | 2 µl de DMSO | Nada | Nada | Nada | 200 µl |

5.10 Se añaden 50 µl de la concentración mayor de cada compuesto utilizado en el ensayo por duplicado a la misma placa de 96 pocillos de los totales (5.7). Se añaden 150 µl de tampón ACE para determinar cualquier fluorescencia de un compuesto.

5.11 Se inicia la reacción por adición de la enzima ACE antes de incubar a 37°C durante 1 hora en un incubador de agitación.

5.12 Se para la reacción por adición de 100 µl de EDTA 2 mM y se incuba a 37°C durante 20 minutos en un incubador de agitación antes de leer en el BMG Fluostar Galaxy (ex320/em420).

## 6. CALCULOS

Se determina la actividad de la enzima ACE en presencia y ausencia del compuesto y se expresa como un porcentaje.

FU= unidades de fluorescencia

MORENO
MADRID
Telé.

(i) % de actividad del control (rendimiento de la enzima)

$$\frac{\text{FU medias de los controles - FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales - FU medias de los blancos}} \times 100$$

(ii) % de actividad con inhibidor

$$\frac{\text{FU medias del compuesto - FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales - FU medias de los blancos}} \times 100$$

(iii) Actividad expresada como % del control:

$$\frac{\text{\% actividad con inhibidor}}{\text{\% actividad del control}} \times 100$$

o

$$\frac{\text{FU medias del compuesto-FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los controles-FU medias de los blancos}} \times 100$$

(iv) % inhibición = 100 - % control

(v) Para los compuestos fluorescentes las FU medias de los blancos que contienen compuesto (5.10) se deducen de las FU medias de los valores del compuesto utilizados para calcular el % de actividad.

MORENO
MADRID

Se ajusta una curva de dosis-respuesta sigmoidal para el % de actividades (% de control) frente a la concentración de compuesto y se calculan los valores de CI50 utilizando el ajuste de curvas LabStats en Excel.

## CONCLUSIONES

Los presentes autores han desarrollado un modelo animal que refleja la respuesta de excitación fisiológica obervada durante la excitación sexual femenina y que refleja directamente los datos clínicos obtenidos en voluntarias humanas. El modelo utiliza tecnologías de láser Doppler para registrar pequeños cambios en el flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo inducidos por la estimulación del nervio pélvico o por neurotransmisores vasoactivos. Durante la excitación sexual, existe un aumento del flujo sanguíneo genital resultante del aumento de inervación del nervio pélvico. El aumento estimulado por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo observado en el modelo animal representa los efectos vasculares endógenos observados durante la excitación sexual femenina, es decir la congestión. Por lo tanto, este modelo puede utilizarse en primer lugar para identificar los mecanismos implicados en la regulación del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo y, en segundo lugar, para validar nuevos enfoques para la

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID

estimulación del flujo sanguíneo genital.

Este estudio ha utilizado exitosamente una combinación de técnicas in vivo, in vitro y bioquímicas para mostrar que el VIP media el flujo sanguíneo genital y para identificar al cAMP como el mediador/segundo mensajero que regula la vasorrelajación genital (y la relajación de la pared vaginal). Utilizando estte modelo animal, se ha demostrado que la infusión de VIP induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo. Utilizando un inhibidor del metabolismo de VIP (por ejemplo un inhibidor NEP EC3.4.24.11) hemos demostrado también que los aumentos del flujo sanguíneo genital observados durante la estimulación del nervio pélvico (es decir excitación sexual) están mediados por el VIP. Se ha mostrado que los aumentos mediados por el VIP en el flujo sanguíneo genital resultan de la elevación de los niveles de cAMP de tejido, mientras que anteriormente se había mostrado que el VIP aumentaba el flujo sanguíneo vaginal en voluntarias sanas, pero el mecanismo celular no estaba identificado. Además, se ha demostrado que el flujo sanguíneo genital puede estimularse directamente con un mimético de cAMP o indirectemente elevando las concentraciones de cAMP con un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 o con un antagonista de receptor de NPY Y1.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MADRID
Tel. [illegible]

La causa principal de FSAD es una reducción del flujo sanguíneo genital y esta se manifiesta como una reducción de la congestión vaginal, labial y clitorídea. El tratamiento de mujeres con FSAD es factible restableciendo la respuesta de excitación sexual normal. Esto puede conseguirse estimulando el flujo sanguíneo genital. El enfoque de los presentes autores para el tratamiento de FSAD será estimular el flujo sanguíneo genital potenciando así la congestión/lubricación vaginal y la congestión/sensibilidad clitorídea por potenciación directa o indirecta de la señalización de cAMP endógeno, por ejemplo con un inhibidor de NEP (EC 3.4.24.11), un inhibidor de PDE hidrolizante de cAMP o un antagonista del receptor de NPY. Esto tendrá el efecto genérico de restablecer o potenciar la respuesta de excitación normal sin efectos secundarios cardiovasculares. Se potenciará la excitación sexual/congestión, más que inducirla simplemente en ausencia de estímulo sexual, que puede ser el caso con algunos agentes vasoactivos administrados exógenamente, por ejemplo el VIP.

En resumen, por lo tanto, la presente invención se refiere, entre otras cosas, a:

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se

PATRICIA KOCH MORENO
Telé:

1934

utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD.

Un procedimiento de tratamiento de una hembra (como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Para estas realizaciones el agente es preferiblemente al menos uno o más de: un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

PATRICIA KOCH MORENO

En una realización altamente preferida, la presente invención se refiere a, entre otras cosas:

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo suministrado oralmente el citado agente.

El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, y siendo suministrado oralmente el citado agente.

Un procedimiento de tratamiento de una hembra (tal como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible]
RID

hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo suministrado oralmente el citado agente.

Para estas realizaciones, el agente es preferiblemente uno o más de: un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

En una realización adicional altamente preferida, la presente invención se refiere, entre otras cosas, a:

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, y potenciando el citado agente el

MORENO

cAMP endógeno.

Un procedimiento de tratamiento de una hembra (tal como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

Para estas realizaciones, el agente es preferiblemente uno o más de: un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

En otra realización altamente preferida, la presente invención se refiere, entre otras cosas, a:

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente

1938

o excipiente farmacéuticamente aceptable, siendo suministrado oralmente el citado agente y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, siendo suministrado oralmente el citado agente y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

Un procedimiento de tratamiento de una hembra (tal como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, estando suministrado oralmente el citado agente y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

Para estas realizaciones, el agente es preferiblemente uno o más de: un I:PDE, un I:NEP o un I:NPY.

Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente como referencia. Diversas modificaciones y variaciones de los procedimientos y del sistema descritos en la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin salirse del alcance y espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención se describe en conexión con realizaciones preferidas específicas, debe comprenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. Es más, están previstas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en bioquímica y biotecnología o campos relacionados, dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

## REFERENCIAS DEL TEXTO GENERAL

Ashur-Fabian, O., Perl. O., Lilling. G., et al., (1999) SNV, a lipophilic superactive VIP analogue, acts through cGMP to promote neuronal survival. *Peptides*, **20**, 629-633.

Berman, J.R., Berman, L. & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: Incidence, pathophysiology, evaluation and treatment options. *Urology*, **54**, 385-391.

AN
113
ADRID
Telef.

Berman, J., Goldstein, I., Werbin, T. et al., (1999a). Double blind placebo controlled study with crossover to assess effect of sildenafil on physiological parameters of the females sexual response. *J. Urol.*, 161, 805.

Burnett, A., Calvin, D., Silver, R., et al., (1997). Immunohistochemical description of nitric oxide sinythase isoforms in human clitoris. *J. Urol.*, 158, 75-78.

*Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV*, American Psychiatric Association, Washington DC. 1987, pág. 493-518.

Fan, Y.P., Chakder, S. & Ratton, S. (1999). Inhibitory effect of zinc protoporhyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal polypeptide and other receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 285, 468-474.

Foda, H.D., Sharaf, H.H., Absood, A. et al. (1995). Pituitary adenilate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides*, 16, 1057-1061.

Frank, E., Anderson, C. & Rubinstein, D. (1978). Frequency

MORENO
MADRID

of sexual dysfunction in "normal" couples. *N. Engl. J. Med.*, **229**, 111-115.

Goldstein, I. & Berman, J.R: (1998). Vasculogenic female sexual dysfunction: vaginal engorgement and clitoral erectile insufficiency syndromes. *Int. J. Impot. Res.*, 10, S84-S90.

Gu, Z.F., Jensen, R.T. & Matton, P.N. (1992). A primary role for protein kinase A in smooth muscle relaxation induced by adrenergic agonists and neuropeptides. *Am. J. Physiol.*, **263**, G360-G364.

Hauser-Kronberger, C., Cheung, A., Hacker, G. et al. (1999). Peptidergic innervation of the human clitoris. *Peptides*, 20, 539-543.

Hoyle, C.H.V., Stones, R.W., Robson, T. et al. (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide containing nerves. *J. Anat.*, **188**, 633-644.

Ingenhoven, N. & Beck-Sickihger, A.G. (1997). Fluorescent labelled analogues of neuropeptide Y for the characterisation of cells expressing NPY receptor subtypes.

[illegible] MORENO
AN
113
MADRID
Telé.

*J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, 17, 407-418.

Jovanovic, A., Jovanovic, S., Tulic, I. et al (1998). Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Human. Reprod.*, 4, 71-76.

Kaplan, H.S. (1974). The New Sex Therapy. Londres. Bailliere Tindall.

Kaplan, S.A., Reis, R.B., Kohm, I.J. et al. (1999). Safety and efficacy of sildenafil in postmenopausal women with sexual dysfunction. *Urology*, 53, 481-486.

Kim, Y.C., Choi, H.K., Ahn, Y.S., et al. (1994). The effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on rabbit cavernosal smooth muscle contractility. *J. Androl.*, 15, 392-739.

Laan, E. & Everaerd, W. (1988). Physiological measures of vaginal vasocongestion. *Int. J. Impot. Res.*, 10, S107-S110.

Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, 10, S104-S106.

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
Telé: [illegible]

Levin, R.J. (1980). The physiology of sexual function in women. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 7, 213-252.

Levin, R.J. (1991). VIP, vagina, clitoral and preurethral glans: An update on female genital arousal. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 98, 61-69.

Levin, R.J. (1992). The mechanisms of human females sexual arousal. *Ann. Rev. Sex. Res.*, 3, 1-48.

Levin, R.J. & Wagner, G. (1986). TRH and vaginal blood flow-effects in conscious women and anaesthetised sheep. *J. Physiol.*, 373, 83p.

Lunberg, J.M., Modin, A. & Malmstrom, R.E. (1996), Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17, 301-304.

Masters, W.H., Johnson, V.E. *Human Sexual Response*, Little, Brown: Boston, 1996.

Ottesen, B., Gerstenberg, T., Ulrichsen, H. et al. (1983). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases vaginal blood flow and inhibits smooth muscle activity in women. *Eur. J. Clin. Invest.*, 13, 321-324.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y ALEMAN
C. [illegible] nº. 113
Telef. [illegible] - MADRID

Ottesen, B., Wagner, G. & Fahrenkrug, J. *Peptide innervation of the sexual organs*. En: Handbook of Sexology, vol. 6, The Pharmacological and Endocrinology of Sexual Function, Sitsen, J.M.A. (ed). Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1988), capítulo 4, pág. 66-97.

Ottensen, B., Pedersen, B., Nielsen, J. et al. (1987). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides*, 8, 797-800.

Park, K., Goldstein, I., Andry, C., et al (1997). Vasculogenic female sexual dysfunction: The hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency, *Int. J. Impotence Res.*, 9, 27-37

Rosen, R., Taylor, J., Leiblum, S. *et al.* (1993). Prevalence of sexual dysfunction in women: results of a survey of 329 women in an outpatient gynecological clinic. *J. Sex. Marital Ther.*, 19, 171-188.

Schiavi, R.C. & Seagraves, R.T. (1995). The biology of sexual function. *Psychiat. Clin. North. Am.*, 18, 7-23.

Schoeffter, P. & Stoclet, J.C. (1985). Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and

PATENT ... MORENO
ING ... Y ALEMAN
C ... 113
Telef. ... MADRID

relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 109, 275-279.

Serradeil-Le Gal, C., Valette, G. Rouby, P.E. et al. (1995). SR 120819A, an orally active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Letters*, 3, 192-196.

Sjoberg, I. (1992). The vagina: Morphological, functional and ecological aspects. *Acta Obst. Gynecol. Scand.*, 71, 84-85.

Spector, I.P. & Carey, M.P. (1990). Incidence and prevalence of sexual dysfunctions: a critical review of empirical literature. *Arch. Sex. Behav.*, 19, 389-408.

Wagner, G. (1992). Aspects of genital physiology and pathology. *Sem. Neurol.*, 12, 87-97.

Werbin, T., Salimpour, P., Berman, L, et al (1999). Effect of sexual stimulation and age on genital blood flow in women with sexual stimulation. *J. Urol.*, 161, 688.

Wincze, J.P., Albert, A. & Bansal, S. (1993). Sexual arousal in diabetic females: Physiological and self-report

PAT... MORENO
ING ... AN
C ... 113
Telf. ... MADRID

measures. *Arch. Sex Behav.*, **22**, 587-601.

Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M. et al (1995). Subtype selectivity and antagonist profile of nonpeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 143-9.

REFERENCIAS PARA LA SECCION PDE

1. Han, P., Fletcher, C.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Yaremko, L.M., Michaeli, T. Assignemt of the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3 and of the human PDE7A gene to chromosome 8q13. Genomics 48: 275-276, 1998.

2. Michaeli, T., Bloom, T.J., Martins. T., Loughney, K., Ferguson, K., Riggs, M., Rodgers, L. Beavo, J.A., Wigler, M.: Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phophodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem., 268: 12925-12932, 1993.

3. Milatovich, A., Bolger, G., Michaeli, T., Francke, U.: Chromosome localization of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse. Somat. Cell. Molec.

PATRICIA ... MORENO
ING... Y ... MAN
c. ... nº, 113
... MADRID
Teléf. ...

Genet. 20:75-86, 1994.

4. Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K., Loughney, K.: Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3-prime, 5-prime-cyclic nucleotide phophodiesterase. Gene 191: 89-95, 1997.

REFERENCIAS PARA LA SECCION NEP

1. Barker, P.E., Shipp, M.A., D'Adamio, L., Masteller, E.L., Reinherz, E.L. The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3(q21-q27). J. Immun. 142:283-287, 1989.

2. D'Adamio, L., Shipp, M.A., Masteller, E.L., Reinherz, E.L.: Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5-prime untranslated regions. Proc. Nat. Acad. Sci. 86:7103-7107, 1989.

3. Letarte, M., Vera, S., Tran, R., Addis, J.B.L., Onizuka, R.J., Quackenbush, E.J., Jongeneel, C.V., McInnes, R.R:: Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to

P[illegible] K[illegible]ER MORENO
[illegible] AN
[illegible] 13
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

neutral endopeptidase. J. Exp. Med. 168:1247-1253, 1988.

4. Shipp, M.A., Vijayaraghavan, J., Schmidt, E.V., Masteller, E.L., D'Adamio, L., Hersh, L.B., Reinherz, E.L.: Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. 86:297-301, 1989.

5. Tran-Paterson, R., Willard, H.F., Letarte, M.: The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 3.4.24.11) gene is located on human cromosome 3. Cancer Genet. Cytogenet 42:129-134, 1989.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPY

1. Allen, J.M., Bloom, S.R.: Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8:1-8, 1986.

2. Bahary, N., Zorich, G., Pachter, J.E., Leibel, R.L., Friedman, J.M.: Molecular genetic linkage maps of mouse chromosomes 4 and 6. Genomics 11:33-47, 1991.

3. Baker, E., Hort, Y.J., Ball, H., Sutherland, G.R., Shine, J., Herzog, H.: Assignment of the human neuropeptide

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]AN
c. [illegible], 113
Teléf. [illegible] - MADRID

| | |
|---|---|
| PALABRAS CLAVE | Receptor de PACAP, receptor de VIP, receptor de VIP con preferencia por helodermina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1640) |
| AUTORES | Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., J., Goosens, J.F., De Neef, P., Waelbroeck, M., y Robberecht, P. |
| TITULO | Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts |
| REVISTA | Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (3), 1617-1624 (1994) |
| MEDLINE | 95110300 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1640 |

PAT[illegible] [illegible]DEHO
[illegible] AN
ING. [illegible] 113
c. [illegible] ADRID
Teléf. [illegible]

Y gene to chromosome 7p15.1 by nonisotopic in situ hybridization. Genomics 26:163-164, 1995.

5. Carr, L.G., Foroud, T., Bice, P., Gobbert, T., Ivashina, J., Edenberg, H., Lumeng. L., Li, T.K.: A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. Alcohol Clin. Exp. Res. 22:884-887, 1998.

5. Dockray, G.J.: Neuropeptide Y: in search of a function. Neurochem. Int. 8:9-11, 1986.

6. Erickson, J.C., Clegg., K.E., Palmiter, R.D.: Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. Nature 381: 415-421, 1996. PubMed ID: 8632796.

7. Erickson, J.C., Hollopeter, G., Palmiter, R.D.: Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274: 1704-1706, 1996.

8. Karvonen, M.K., Pesonen, U., Koulu, M., Niskanen, L., Laakso, M., Rissanen, A., Dekker, J.M., t'Hart, L.M., Valve, R., Uusitupa, M.I.: Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL

PAT[illegible] MORENO
INO[illegible] AN
[illegible] 113
C [illegible] ADRID
Telé. [illegible]

cholesterol levels. Nature Med. 4:1434-1437, 1998.

9. Maccarrone, C., Jarrott., B.; Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8:13-22, 1986.

10. Meisler, M.H., Spence, J.E., Dixon, J.E., Caldwell, R.M., Minth, C.D., Beaudet, A.L.: Exclusion of close linkage between the loci for cystic fibrosis and neuropeptide Y on human cromosome 7. Cytogenet. Cell Genet. 44:175-176, 1987.

11. Minth, C.D., Andrews, P.C., Dixon, J.E.: Characterization, sequence and expression of the cloned human neuropeptide Y gene. J. Biol. Chem. 261:11974-11979, 1986.

12. Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M., Dixon, J.E.: Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptidase tyrosine. Proc. Nat. Acad. Sci. 81:4577-4581, 1984.

13. Takeuchi, T., Gumucio, D., Eddy, R., Meisler, M., Minth, C. Dixon, J., Yamada, T., Shows, T.: Assignment of the related pancreatic polypeptide (PPY) and neuropeptide Y (NPY) genes to regions on human chromosomes 17 and 7.

PATENTES MORENO
INGL AN
113
ADRID
Telef.

(Resumen) Cytogenet. Cell. Genet. 40:759 sólo, 1985.

14. Takeuchi, T., Gumucio, D.L., Yamada, T., Meisler, M.H., Minth, C.D., Dixon, J.E., Eddy, R.E., Shows, T.B.: Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. J. Clin. Invest. 77:1038-1041, 1986.

15. Terenghi, G., Polak, J.M., Hamid, Q., O'Brien, E., Denny, P., Legon, S., Dixon, J., Minth, C.D., Palay, S.L., Yasargil, G., Chan-Palay, V.: Localization of neuropeptide Y mRNA in neurons of human cerebral cortex by means of in situ hybridization with a complementary RNA probe. Proc. Nat. Acad. Sci. 84:7315-7318, 1987.

16. Thiele, T.E., Marsh, D.J., Ste. Marie, L., Bernstein, O.L., Palmiter, R.D.: Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. Nature 396:366-369, 1998.

17. Uusitupa, M.I.J., Karvonen, M.K., Pesonen, U., Koulu, M.: Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism. Ann. Med. 30:508-510, 1998.

PATENTES [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMAN
[illegible], 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPYR1

1. Herzog, H., Baumgartner, M., Vivero, C., Selbie, L.A., Auer, B., Shine, J.: Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor. J. Biol. Chem. 268:6703-6707, 1993.

2. Herzog, H., Darby, K., Ball, H., Hort, Y., Beck-Sickinger, A., Shine, J.: Overlapping gene stucture of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests coordinate transcriptional regulation, Genomics 41:315-319, 1997.

3. Herzog, H., Hort, Y.J., Ball, H.J., Hayes, G., Shine, J., Selbie, L.A.: Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. Proc. Nat. Acad. Sci. 89:5974-5798, 1992.

4. Larhammar, D., Blomqvist, A.G., Yee, F., Jazin, E., Yoo, H., Whalestedt, C.: Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. J. Biol. Chem. 267:10935-10938, 1992.

5. Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson,

MORENO
CAN
113
ADRID
Teléf.

D.A.: Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41:498-500, 1997.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPYR2

1. Ammar, D.A., Eadie, D.M., Wong, D.J., Ma, Y.-Y., Kolakowski, L.F. Jr., Yang-Feng, T.L., Thompson, D.A.: Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide Y receptor gene. Genomics 38:392-398, 1996.

2. Gerald, C., Walker, M.W:, Vaysse, P., J.-J., He, C., Brancheck, T.A., Weinsahnk, R.L.: Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. J. Biol. Chem. 270: 26758-26761, 1995.

3. Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson, D.A.: Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

4. Rose, P.M., Fernandes, P., Lynch, J.S., Frazier, S.T.,

..AN
INC ... 113
... ADRID
Telé.

Fisher, S.M., Kodukula, K., Kienzle, B., Seethala, R.: Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. J. Biol. Chem. 270:22661-22664, 1995.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VIP

1. Bodner, M., Fridkin, M. Gozes, I.: Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3548-3551, 1985.

2. Gotoh, E., Yamagami, T., Yamamoto, H., Okamoto, H.: Chromosomal assignment of human VIP/PHM-27 gene to 6q26-q27 region by spot blot hybridization and in situ hybridization. Biochem. Int. 17:555-562, 1988.

3. Gozes, I., Avidor, R., Yahav, Y., Katznelson, D. Croce, C.M., Huebner, K.: The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21-6qter. Hum. Genet. 75:41-44, 1987.

4. Gozes, I., Nakai, H., Byers, M., Avidor, R., Weinstein, Y., Shani, Y., Shows, T.B.: Sequential expression in the nervous system of C-MYB and VIP genes, located in human

MORENO
ALEMAN
13
MADRID
Teléf.

chromosomal region 6q24. Somat. Cell. Molec. Genet. 13:305-313, 1987.

5. Heinz-Erian, P., Dey. R.D., Flux, M. Said, S.I.: Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. Science 229: 1407-1408, 1985.

6. Itoh, N., Obata, K., Yanaihara, N., Okamoto, H.: Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature 304:547-549, 1983.

7. Linder, S., Barkhem, T., Norberg, A., Persson, H., Schalling, M., Hokfelt, T., Magnusson, G.: Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. Proc. Nat. Acad. Sci. 84:605-609, 1987.

8. Omary, M.B., Kagnoff, M.F.: Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line. Science 238: 1578-1581, 1987.

REFERENCIAS PARA LA SECCION AC

1. Parma, J., Stengel, D., Gannage, M.-H., Poyard, M., Barouki, R., Hanoune, J.: Sequence of a human brain

PATRICIA [illegible] MORENO
INGENIERO [illegible]
C, [illegible] 113
Telf. [illegible] MADRID

adenylyl cyclase partial cDNA: evidence for a consensus cyclase domain. Biochem. Biophys. Rs. Commun. 179:455-462, 1991.

2. Stengel, D., Parma, J., Gannage, M.-H., Roeckel, N., Mattei, M.-G., Barouki, R., Hanoune, J.: Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. Hum. Genet. 90:126-130, 1992.

REFERENCIAS PARA LA SECCION VPAC1

1. Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Darmoul, D., Maoret, J.-J., Carrero, I., Ogier-Denis, E., Laburthe, M.: Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNS encoding proteins with different N-terminal domains. Biochem. Biopys. Res. Commun. 200:769-776, 1994.

2. Hashimoto, H., Nishino, A., Shintani, N., Hagihara, N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Yamamoto, K., Matsuda, T., Ishihara, T., Nagata, S., Baba, A.: Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VPAC-1) receptor. Genomics 58:90-93, 1999.

3. Libert, F., Passage, E., Parmentier, M., Simons, M.-J., Vassart, G., Mattei, M.-G., Chromosomal mapping of A1 and

MORENO
MAN
113
MADRID
Teléf.

A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonine receptor. Genomics 11: 225-227, 1991.

4. Sreedharan, S.P., Huang, J.-X., Cheung, M.-C., Goetzl, E.J.: Structure, expression and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. Proc. Nat. Acad. Sci. 92:2939-2943, 1995.

5. Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Huang, J.-X., Goetzl, E.J.: Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193:546-553, 1993.

6. Sreedharan, S.P., Robichon, A., Peterson, K.E., Goetzl, E.J.: Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. 88:4986-4990, 1991.

7. Vassart, G.: Personal Communication. Bruselas, Bélgica, 1-15-1992.

8. Wenger, G.D.: Personal Communication, Columbus, Ohio, 8-3-1993.

F[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VPAC2

1. Adamou, J.E., Aiyar, N., Van Horn, S., Elshourbagy, N.A.: Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 209:385-392, 1995.

2. MacKay, M., Fantes, J., Scherer, S., Boyle, S., West, K., Tsui, L.-C., Belloni, E., Lutz, E., Van Heyningen, V., Harmar, A.J.: Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. Genomics 37:345-353, 1996.

3. Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., Goosens, J.-F., De Neef, P., Waelbroeck, M. Robberecht, P.: Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochem. Biophy. Res. Commun. 205:1617-1624, 1994.

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLES Y [illegible]
[illegible] 113
MADRID
Telé

# LISTADO DE SECUENCIAS

## 1. NEP (EC 3.4.24.11)

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSMRNAEN 3181 pb mRNA PRI 12-sep-1993 |
| DEFINICION | mRNA humano para encefalinasa (EC 3.4.24.11) |
| ACCESO | X07166 |
| NID | g34757 |
| VERSION | X07166.1 GI: 34757 |
| PALABRAS CLAVE | encefalinasa, metaloproteína, endopeptidasa neutra |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 3181) |
| AUTORES | Malfroy, B., Kuang, W.J., Seeburg, P.H., Mason, A.J. y Schofield, P.R. |
| TITULO | Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). |
| REVISTA | FEBS. Lett. 229 (1), 206-210 (1998) |
| MEDLINE | 88152222 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |

PAT... MORENO
ING. ... LAMAN
... 13
... MADRID
Telf. ...

1961

source 1...3181

/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/tissue_type="placenta"
/clone_lib="lambda gt10"
/clone="lambda H7"

CDS 18..2249

/note="enkephalinase (AA 1-743)"
/codon_start=1
/protein_id="CAA30157.1"
/db_xref="PID:g34758"
/db_xref="GI:34758"
/db_xref="SWISS-PROT:P08473"
/translation="MDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYAT
YDDGICKSSDCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKYACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDI
LRDELEVVLKDVLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINESAIDSRGGEPLLKLLPDIYGW
PVATENWEQKYGASWTAEKAIAQLNSKYGKKVLINLFVGTDDKNSVNHVIHIDQPRLG
LPSRDYYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDENQLALEMNKVMELEKEI
ANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSLEINGKPFSWLNFTNEIMSTVNISITNE
EDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTYKESRNAFRKALY
GTTSETATWRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDD
LTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNKLNNEYLELNYKEDEYFENIIQNL
KFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSL
NYGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSASNFKEQSQCMVYQYGNFSW
DLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLGQAYRAYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQLFFLN
FAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEKKC
RVW"

misc_feature 3073..3078

/note="poly A signal"

RECUENTO DE BASES 1055 a, 582 c, 657 g, 887 t

ORIGEN

1 gcaagtcaga aagtcagatg gatataactg atatcaacac tccaaagcca aagaagaaac
61 agcgatggac tccactggag atcagcctct cggtccttgt cctgctcctc accatcatag
121 ctgtgacaat gatcgcactc tatgcaacct acgatgatgg tatttgcaag tcatcagact
181 gcataaaatc agctgctcga ctgatccaaa acatggatgc caccactgag ccttgtacag

PATENTA K.P MARENO
ING. Y L. AN
113
C MADRID
Tel:

```
 241 actttttcaa atatgcttgc ggaggctggt tgaaacgtaa tgtcattccc gagaccagct
 301 cccgttacgg caactttgac attttaagag atgaactaga agtcgttttg aaagatgtcc
 361 ttcaagaacc caaaactgaa gatatagtag cagtgcagaa agcaaaagca ttgtacaggt
 421 cttgtataaa tgaatctgct attgatagca gaggtggaga acctctactc aaactgttac
 481 cagacatata tgggtggcca gtagcaacag aaaactggga gcaaaaatat ggtgcttctt
 541 ggacagctga aaaagctatt gcacaactga attctaaata tgggaaaaaa gtccttatta
 601 atttgtttgt tggcactgat gataagaatt ctgtgaatca tgtaattcat attgaccaac
 661 ctcgacttgg cctcccttct agagattact atgaatgcac tggaatctat aaagaggctt
 721 gtacagcata tgtggatttt atgatttctg tggccagatt gattcgtcag gaagaaagat
 781 tgcccatcga tgaaaaccag cttgctttgg aaatgaataa agttatggaa ttggaaaaag
 841 aaattgccaa tgctacggct aaacctgaag atcgaaatga tccaatgctt ctgtataaca
 901 agatgacatt ggcccagatc caaaataact tttcactaga gatcaatggg aagccattca
 961 gctggttgaa tttcacaaat gaaatcatgt caactgtgaa tattagtatt acaaatgagg
1021 aagatgtggt tgtttatgct ccagaatatt taaccaaact taagcccatt cttaccaaat
1081 attctgccag agatcttcaa aatttaatgt cctggagatt cataatggat cttgtaagca
1141 gcctcagccg aacctacaag gagtccagaa atgctttccg caaggccctt tatggtacaa
1201 cctcagaaac agcaacttgg agacgttgtg caaactatgt caatgggaat atggaaaatg
1261 ctgtggggag gctttatgtg gaagcagcat ttgctggaga gagtaaacat gtggtcgagg
1321 atttgattgc acagatccga gaagttttta ttcagacttt agatgacctc acttggatgg
1381 atgccgagac aaaaaagaga gctgaagaaa aggccttagc aattaaagaa aggatcggct
1441 atcctgatga cattgtttca aatgataaca aactgaataa tgagtacctc gagttgaact
1501 acaaagaaga tgaatacttc gagaacataa ttcaaaattt gaaattcagc caaagtaaac
1561 aactgaagaa gctccgagaa aaggtggaca aagatgagtg gataagtgga gcagctgtag
1621 tcaatgcatt ttactcttca ggaagaaatc agatagtctt cccagccggc attctgcagc
1681 cccccttctt tagtgcccag cagtccaact cattgaacta tgggggcatc ggcatggtca
1741 taggacacga aatcacccat ggcttcgatg acaatggcag aaactttaac aaagatggag
1801 acctcgttga ctggtggact caacagtctg caagtaactt taaggagcaa tcccagtgca
1861 tggtgtatca gtatggaaac ttttcctggg acctggcagg tggacagcac cttaatggaa
1921 ttaatacact gggagaaaac attgctgata atggaggtct tggtcaagca tacagagcct
1981 atcagaatta tattaaaaag aatggcgaag aaaaattact tcctggactt gacctaaatc
2041 acaaacaact atttttcttg aactttgcac aggtgtggtg tggaacctat aggccagagt
2101 atgcggttaa ctccattaaa acagatgtgc acagtccagg caatttcagg attattggga
2161 ctttgcagaa ctctgcagag ttttcagaag cctttcactg ccgcaagaat tcatacatga
2221 atccagaaaa gaagtgccgg gtttggtgat cttcaaaaga agcattgcag cccttggcta
2281 gacttgccaa caccacagaa atggggaatt ctctaatcga aagaaaatgg gccctagggg
2341 tcactgtact gacttgaggg tgattaacag agagggcacc atcacaatac agataacatt
2401 aggttgtcct agaaagggtg tggagggagg aagggggtct aaggtctatc aagtcaatca
2461 tttctcactg tgtacataat gcttaatttc taaagataat attactgttt atttctgttt
2521 ctcatatggt ctaccagttt gctgatgtcc ctagaaaaca atgcaaaacc tttgaggtag
2581 accaggattt ctaatcaaaa gggaaaagaa gatgttgaag aatacagtta ggcaccagaa
2641 gaacagtagg tgacactata gtttaaaaca cattgcctaa ctactagttt ttacttttat
2701 ttgcaacatt tacagtccct caaaatcctt ccaaagaatt cttatacaca ttggggcctt
2761 ggagcttaca tagttttaaa ctcatttttg ccatacatca gttattcatt ctgtgatcat
2821 ttattttaag cactcttaaa gcaaaaaatg aatgtctaaa attgtttttt gttgtacctg
2881 ctttgactga tgctgagatt cttcaggctt cctgcaattt tctaagcaat ttcttgctct
2941 atctctcaaa acttggtatt tttcagagat ttatataaat gtaaaaataa taatttttat
3001 atttaattat taactacatt tatgagtaac tattattata ggtaatcaat gaatattgaa
3061 gtttcagctt aaaataaaca gttgtgaacc aagatctata aagcgatata cagatgaaaa
3121 tttgagacta tttaaactta taaatcatat tgatgaaaag atttaagcac aaactttagg
3181 g
```

[illegible] MORENO
[illegible] AN
ING. [illegible] 13
[illegible] DRID
Telé. [illegible]

1963

2. **PDE de tipo 1**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSPDE1A3A 2008 pb mRNA PRI 12-abr-1996 |
| DEFINICION | mRNA de fosfodiesterasa de nucleótidos 3',5'-cíclicos humana (HSPDE1A3A), cd completo. |
| ACCESO | U40370 |
| NID | g1151108 |
| VERSION | U40370.1 GI: 1151108 |
| PALABRAS CLAVE | fosfodiesterasa estimulada por calmodulina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 2008) |
| AUTORES | Loughney, K., Martins., T.J., Harris, E.A., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., y Ferguson, K. |
| TITULO | Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterases |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 271 (2), 796-806 (1996) |
| MEDLINE | 96132810 |

PATRICIA HEAN MORENO
INGLES Y AL AN
C ... 113
... ADRID
Telf: ...

1964

REFERENCIA 2 (bases 1 a 2008)

AUTORES Loughney, K., Martins., T.J., Harris, E.A.S., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., y Ferguson, K.

TITULO Envío directo

REVISTA Enviado el 7 de noviembre de 1995. Kate Loughney, ICOS, 22021 20th Ave. S.E., Bothell, WA 98021, EE.UU.

```
CARACTERISTICAS          Localización/Cualificadores
source                   1...2008
                       /organism="Homo sapiens"
                       /db_xref="taxon:9606"
   gene                85..1692
                       /gene="PDE1A"
   CDS                 85..1692
                       /gene="PDE1A"
                       /note="PDE1A3; type I phosphodiesterase"
                       /codon_start=1
                       /product="3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase"
                       /protein_id="AAC50436.1"
                       /db_xref="PID:g1151109"
                       /db_xref="GI:1151109"
                       /translation="MGSSATEIEELENTTFKYLTGEQTEKMWQRLKGILRCLVKQLER
                       GDVNVVDLKKNIEYAASVLEAVYIDETRRLLDTEDELSDIQTDSVPSEVRDWLASTFT
                       RKMGMTKKKPEEKPKFRSIVHAVQAGIFVERMYRKTYHMVGLAYPAAVIVTLKDVDKW
                       SFDVFALNEASGEHSLKFMIYELFTRYDLINRFKIPVSCLITFAEALEVGYSKYKNPY
                       HNLIHAADVTQTVHYIMLHTGIMHWLTELEILAMVFAAAIHDYEHTGTTNNFHIQTRS
                       DVAILYNDRSVLENHHVSAAYRLMQEEEMNILINLSKDDWRDLRNLVIEMVLSTDMSG
                       HFQQIKNIRNSLQQPEGIDRAKTMSLILHAADISHPAKSWKLHYRWTMALMEEFFLQG
                       DKEAELGLPFSPLCDRKSTMVAQSQIGFIDFIVEPTFSLLTDSTEKIVIPLIEEASKA
                       ETSSYVASSSTTIVGLHIADALRRSNTKGSMSDGSYSPDYSLAAVDLKSFKNNLVDII
                       QQNKERWKELAAQEARTSSQKCEFIHQ"
```

RECUENTO DE BASES 627 a, 400 c, 437 g, 544 t

...MAN
...113
... MADRID
Teléf. ...

ORIGEN

```
   1 gaattctgat gtgcttcagt gcacagaaca gtaacagatg agctgctttt ggggagagct
  61 tgagtactca gtcggagcat catcatgggg tctagtgcca cagagattga agaattggaa
 121 aacaccactt ttaagtatct tacaggagaa cagactgaaa aaatgtggca gcgcctgaaa
 181 ggaatactaa gatgcttggt gaagcagctg gaaagaggtg atgttaacgt cgtcgactta
 241 aagaagaata ttgaatatgc ggcatctgtg ctggaagcag tttatatcga tgaaacaaga
 301 agacttctgg atactgaaga tgagctcagt gacattcaga ctgactcagt cccatctgaa
 361 gtccgggact ggtttggctc taccttttaca cggaaaatgg ggatgacaaa aaagaaacct
 421 gaggaaaaac caaaatttcg gagcattgtg catgctgttc aagctggaat ttttgtggaa
 481 agaatgtacc gaaaaacata tcatatggtt ggtttggcat atccagcagc tgtcatcgta
 541 acattaaagg atgttgataa atggtctttc gatgtatttg ccctaaatga agcaagtgga
 601 gagcatagtc tgaagtttat gatttatgaa ctgtttacca gatatgatct tatcaaccgt

 661 ttcaagattc ctgtttcttg cctaatcacc tttgcagaag ctttagaagt tggttacagc
 721 aagtacaaaa atccatatca caatttgatt catgcagctg atgtcactca aactgtgcat
 781 tacataatgc ttcatacagg tatcatgcac tggctcactg aactggaaat tttagcaatg
 841 gtctttgctg ctgccattca tgattatgag catacaggga caacaaacaa ctttcacatt
 901 cagacaaggt cagatgttgc cattttgtat aatgatcgct ctgtccttga gaatcaccac
 961 gtgagtgcag cttatcgact tatgcaagaa gaagaaatga atatcttgat aaatttatcc
1021 aaagatgact ggagggatct tcggaaccta gtgattgaaa tggttttatc tacagacatg
1081 tcaggtcact tccagcaaat taaaaatata agaaacagtt tgcagcagcc tgaagggatt
1141 gacagagcca aaaccatgtc cctgattctc cacgcagcag acatcagcca cccagccaaa
1201 tcctggaagc tgcattatcg gtggaccatg gccctaatgg aggagttttt cctgcaggga
1261 gataaagaag ctgaattagg gcttccattt tccccacttt gtgatcggaa gtcaaccatg
1321 gtggcccagt cacaaatagg tttcatcgat ttcatagtag agccaacatt ttctcttctg
1381 acagactcaa cagagaaaat tgttattcct cttatagagg aagcctcaaa agccgaaact
1441 tcttcctatg tggcaagcag ctcaaccacc attgtggggt tacacattgc tgatgcacta
1501 agacgatcaa atacaaaagg ctccatgagt gatgggtcct attccccaga ctactccctt
1561 gcagcagtgg acctgaagag tttcaagaac aacctggtgg acatcattca gcagaacaaa
1621 gagaggtgga aagagttagc tgcacaagaa gcaagaacca gttcacagaa gtgtgagttt
1681 attcatcagt aaacaccttt aagtaaaacc tcgtgcatgg tggcagctct aatttgacca
1741 aaagacttgg agattttgat tatgcttgct ggaaatctac cctgtcctgt gtgagacagg
1801 aaatctattt ttgcagattg ctcaataagc atcatgagcc acataaataa cagctgtaaa
1861 ctccttaatt caccgggctc aactgctacc gaacagattc atctagtggc tacatcagca
1921 ccttgtgctt tcagatatct gtttcaatgg catttgtgg catttgtctt taccgagtgc
1981 caataaattt tctttgagca aaaaaaaa
```

2. **PDE de tipo 2**

LOCUS HSU67733 4240 pb mRNA PRI 21-may-1997
DEFINICION mRNA de fosfodiesterasa de nucleótidos

[illegible] MORENO
INGE[illegible]
[illegible] 113
[illegible]DRID
Telé. [illegible]

| | |
|---|---|
| | 3',5'-cíclicos humana estimulada por cGMP PDE2A3 (PDE2A), cd completo. |
| ACCESO | U67733 |
| NID | g2108051 |
| VERSION | U67733.1 GI: 2108051 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 4240) |
| AUTORES | Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K. and Loughley, K. |
| TITULO | Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterase |
| REVISTA | Gene 191 (1), 89-95 (1997) |
| MEDLINE | 97354299 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 4240) |
| AUTORES | Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K. and Loughley, K. |
| TITULO | Envío directo |

PATRICIA KOSH MORENO
ING · · · · AN
· · · · ·
· · · RID
Tel: · · · ·

1967
1968

REVISTA Enviado el 21 de agosto de 1996. ICOS Corporation, 22021 20th Ave. S.E., Bothell, WA 98021, EE.UU.

```
CARACTERISTICAS        Localización/Cualificadores
5    source            1...4240
                       /organism="Homo sapiens"
                       /db_xref="taxon:9606"
     gene              162..2987

                    /gene="PDE2A"
     CDS            162..2987
                    /gene="PDE2A"
                    /function="cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide
                    phosphodiesterase"
                    /note="PDE2 family; splice variant 3"
                    /codon_start=1
                    /product="PDE2A3"
                    /protein_id="AAC51320.1"
                    /db_xref="PID:g2108052"
                    /db_xref="GI:2108052"
                    /translation="MGQACGHSILCRSQQYPAARPAEPRGQQVFLKPDEPPPPPQPCA
                    DSLQDALLSLGSVIDISGLQRAVKEALSAVLPRVETVYTYLLDGESQLVCEDPPHELP
                    QEGKVREAIISQKRLGCNGLGFSDLPGKPLARLVAPLAPDTQVLVMPLADKEAGAVAA
                    VILVHCGQLSDNEEWSLQAVEKHTLVALRRVQVLQQRGPREAPRAVQNPPEGTAEDQK
                    GGAAYTDRDRKILQLCGELYDLDASSLQLKVLQYLQQETRASRCCLLLVSEDNLQLSC
                    KVIGDKVLGEEVSFPLTGCLGQVVEDKKSIQLKDLTSEDVQQLQSMLGCELQAMLCVP
                    VISRATDQVVALACAFNKLEGDLFTDEDEHVIQHCFHYTSTVLTSTLAFQKEQKLKCE
                    CQALLQVAKNLFTHLDDVSVLLQEIITEARNLSNAEICSVFLLDQNELVAKVFDGGVV
                    DDESYEIRIPADQGIAGHVATTGQILNIPDAYAHPLFYRGVDDSTGFRTRNILCFPIK
                    NENQEVIGVAELVNKINGPWFSKFDEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHL
                    ANEMMMYHMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQ
                    DMNFINNYKIDCPTLARFCLMVKKGYRDPPYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLE
                    DIEIFALFISCMCHDLDHRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSVMERHHFAQAIAILNT
                    HGCNIFDHFSRKDYQRMLDLMRDIILATDLAHHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHHRL
                    LLCLLMTSCDLSDQTKGWKTTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIP
                    ELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNREHWTKVSHKFTIRGLPSNNSLD
                    FLDEEYEVPDLDGTRAPINGCCSLDAE"
```

RECUENTO DE BASES 902 a, 1260 c, 1202 g, 876 t

10

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y [illegible]
[illegible] MADRID
Telf. [illegible]

1968

ORIGEN

```
   1 cagcagagct ggattggggt gttgagtcca ggctgagtag ggggcagccc actgctcttg
  61 gtccctgtgc ctgctggggg tgccctgccc tgaactccag gcagcgggga cagggcgagg
 121 tgccacctta gtctggctgg ggaggcggac gatgaggagt gatggggcag gcatgcggcc
 181 actccatcct ctgcaggagc cagcagtacc cggcagcgcg accggctgag ccgcggggcc
 241 agcaggtctt cctcaagccg gacgagccgc cgccgccgcc gcagccatgc gccgacagcc
 301 tgcaggacgc cttgctgagt ctgggctctg tcatcgacat ttcaggcctg caacgtgctg
 361 tcaaggaggc cctgtcagct gtgctccccc gagtggaaac tgtctacacc tacctactgg
 421 atggtgagtc ccagctggtg tgtgaggacc ccccacatga gctgccccag gaggggaaag
 481 tccgggaggc tatcatctcc cagaagcggc tgggctgcaa tgggctgggc ttctcagacc
 541 tgccagggaa gcccttggcc aggctggtgg ctccactggc tcctgatacc caagtgctgg
 601 tcatgccgct agcggacaag gaggctgggg ccgtggcagc tgtcatcttg gtgcactgtg
 661 gccagctgag tgataatgag gaatggagcc tgcaggcggt ggagaagcat accctggtcg
 721 ccctgcggag ggtgcaggtc ctgcagcagc gcgggcccag ggaggctccc cgagccgtcc
 781 agaacccccc ggaggggacg gcggaagacc agaagggcgg ggcggcgtac accgaccgcg
 841 accgcaagat cctccaactg tgcggggaac tctacgacct ggatgcctct tccctgcagc
 901 tcaaagtgct ccaatacctg cagcaggaga cccgggcatc ccgctgctgc ctcctgctgg
 961 tgtcggagga caatctccag ctttcttgca aggtcatcgg agacaaagtg ctcggggaag
1021 aggtcagctt tcccttgaca ggatgcctgg gccaggtggt ggaagacaag aagtccatcc
1081 agctgaagga cctcacctcc gaggatgtac aacagctgca gagcatgttg ggctgtgagc
1141 tgcaggccat gctctgtgtc cctgtcatca gccgggccac tgaccaggtg gtggccttgg
1201 cctgcgcctt caacaagcta gaaggagact tgttcaccga cgaggacgag catgtgatcc
1261 agcactgctt ccactacacc agcaccgtgc tcaccagcac cctggccttc cagaaggaac
1321 agaaactcaa gtgtgagtgc caggctcttc tccaagtggc aaagaacctc ttcacccacc
1381 tggatgacgt ctctgtcctg ctccaggaga tcatcacgga ggccagaaac ctcagcaacg
1441 cagagatctg ctctgtgttc ctgctggatc agaatgagct ggtggccaag gtgttcgacg
1501 ggggcgtggt ggatgatgag agctatgaga tccgcatccc ggccgatcag ggcatcgcgg
1561 gacacgtggc gaccacgggc cagatcctga acatccctga cgcatatgcc catccgcttt
1621 tctaccgcgg cgtggacgac agcaccggct tccgcacgcg caacatcctc tgcttcccca
```

... MORENO
INGLES Y ...AN
c. ... 113
... ADRID
Teléf. ...

```
1681 tcaagaacga gaaccaggag gtcatcggtg tggccgagct ggtgaacaag atcaatgggc
1741 catggttcag caagttcgac gaggacctgg cgacggcctt ctccatctac tgcggcatca
1801 gcatcgccca ttctctccta tacaaaaaag tgaatgaggc tcagtatcgc agccacctgg
1861 ccaatgagat gatgatgtac cacatgaagg tctccgacga tgagtatacc aaacttctcc
1921 atgatgggat ccagcctgtg gctgccattg actccaattt tgcaagtttc acctataccc
1981 ctcgttccct gcccgaggat gacacgtcca tggccatcct gagcatgctg caggacatga
2041 atttcatcaa caactacaaa attgactgcc cgaccctggc ccggttctgt ttgatggtga
2101 agaagggcta ccgggatccc ccctaccaca actggatgca cgccttttct gtctcccact
2161 tctgctacct gctctacaag aacctggagc tcaccaacta cctcgaggac atcgagatct
2221 ttgccttgtt tatttcctgc atgtgtcatg acctggacca cagaggcaca aacaactctt
2281 tccaggtggc ctcgaaatct gtgctggctg cgctctacag ctctgagggc tccgtcatgg
2341 agaggcacca ctttgctcag gccatcgcca tcctcaacac ccacggctgc aacatctttg
2401 atcatttctc ccggaaggac tatcagcgca tgctggatct gatgcgggac atcatcttgg
2461 ccacagacct ggcccaccat ctccgcatct tcaaggacct ccagaagatg gctgaggtgg
2521 gctacgaccg aaacaacaag cagcatcaca gacttctcct ctgcctcctc atgacctcct
2581 gtgacctctc tgaccagacc aagggctgga agactacgag aaagatcgcg gagctgatct
2641 acaaagaatt cttctcccag ggagacctgg agaaggccat gggcaacagg ccgatggaga
2701 tgatggaccg ggagaaggcc tatatccctg agctgcaaat cagcttcatg gagcacattg
2761 caatgcccat ctacaagctg ttgcaggacc tgttccccaa agcggcagag ctgtacgagc
2821 gcgtggcctc caaccgtgag cactggacca aggtgtccca caagttcacc atccgcggcc
2881 tcccaagtaa caactcgctg gacttcctgg atgaggagta cgaggtgcct gatctggatg
2941 gcactagggc ccccatcaat ggctgctgca gccttgatgc tgagtgatcc cctccaggac
3001 acttccctgc ccaggccacc tcccacagcc ctccactggt ctggccagat gcactgggaa
3061 cagagccacg ggtcctgggt cctagaccag gacttcctgt gtgaccctgg acaagtacta
3121 ccttcctggg cctcagcttt ctcgtctgta taatggaagc aagacttcca acctcacgga
3181 gactttgtaa tttgcttctc tgagagcaca ggggtgacca atgagcagtg ggccctactc
3241 tgcacctctg accacacctt ggcaagtctt tcccaagcca ttctttgtct gagcagcttg
3301 atggtttctc cttgccccat ttctgcccca ccagatcttt gctcctttcc ctttgaggac
3361 tcccacccct tgggtctcca ggatcctcat ggaaggggaa ggtgagacat ctgagtgagc
3421 agagtgtggc atcttggaaa cagtccttag ttctgtggga ggactagaaa cagccgcggc
3481 gaaggccccc tgaggaccac tactatactg atggtgggat tgggacctgg gggatacagg
3541 ggccccagga agaagctggc cagaggggca gctcagtgct ctgcagagag gggccctggg
3601 gagaagcagg atgggattga tgggcaggag ggatccccgc actgggagac aggcccaggt
3661 atgaatgagc cagccatgct tcctcctgcc tgtgtgacgc tgggcgagtc tcttcccctg
3721 tctgggccaa acagggagcg ggtaagacaa tccatgctct aagatccatt ttagatcaat
3781 gtctaaaata gctctatggc tctgcggagt cccagcagag gctatggaat gtttctgcaa
3841 ccctaaggca cagagagcca accctgagtg tctcagaggc cccctgagtg ttccccttgg
3901 cctgagcccc ttacccattc ctgcagccag tgagagacct ggcctcagcc tggcagcgct
3961 ctcttcaagg ccatatccac ctgtgccctg gggcttggga gaccccatag gccgggactc
4021 ttgggtcagc ccgccactgg cttctctctt tttctccgtt tcattctgtg tgcgttgtgg
4081 ggtgggggag gggtccacc tgccttacct ttctgagttg cctttagaga gatgcgtttt
4141 tctaggactc tgtgcaactg tcgtatatgg tcccgtgggc tgaccgcttt gtacatgaga
4201 ataaatctat ttctttctac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

## 4. NPY

| | |
|---|---|
| LOCUS | HUMNPY 551 pb mRNA PRI 7-ene-1995 |
| DEFINICION | mRNA de neuropéptido Y humano (NPY), cd completo. |
| ACCESO | K01911 |
| NID | g189273 |
| VERSION | K01911.1 GI:189273 |
| PALABRAS CLAVE | neuropéptido Y |
| FUENTE | feocromocitoma humano, cDNA a mRNA, clon pNPY3-75 |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 551) |
| AUTORES | Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M. y Dixon, J.E. |
| TITULO | Cloning, characterization and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine |
| REVISTA | Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (14), 4577-4581 (1984) |
| MEDLINE | 84272678 |
| COMENTARIO | El neuropéptido Y (NPY) es uno de los péptidos más abundantes en el sistema |

MORENO
AN
13
ADRID
Telc.

nervioso mamífero, y su extensa distribución sugiere un papel neurotransmisor o modulador. También se encuentra en algunas células de cromafina de la médula suprarrenal.

```
CARACTERISTICAS          Localización/Cualificadores
source              1...551
                    /organism="Homo sapiens"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /tissue_type="phaeochromocytoma"
                    /map="7pter-q22"
  mRNA              <1..551
                    /gene="NPY"
                    /note="G00-119-456"
  gene              1..551
                    /gene="NPY"
  sig_peptide       87..170
                    /gene="NPY"
                    /note="G00-119-456"
  CDS               87..380
                    /gene="NPY"
                    /codon_start=1
                    /db_xref="GDB:G00-119-456"
                    /product="neuropeptide Y"
                    /protein_id="AAA59944.1"
                    /db_xref="PID:g189274"
                    /db_xref="GI:189274"
                    /translation="MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAED
                    MARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRLEDPAMW"
  mat_peptide       171..278
                    /gene="NPY"
                    /note="G00-119-456"
                    /product="neuropeptide Y"
```

RECUENTO DE BASES 131 a, 171 c, 129 g, 120 t

P… AN … .13 … A…RID Telé…

ORIGEN 51 pb cadena arriba de un sitio RsaI

```
  1 accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc
 61 ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgactgggg ctgtccggac
121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgaggcg taccccctca
181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
301 cactgatttc agacctcttg atgagagaaa gcacagaaaa tgttcccaga actcggcttg
361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
421 gcccatattt catcgtgtaa aacgagaatc cacccatcct accaatgcat gcagccactg
481 tgctgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
541 atcatgcatt c
```

## 5. Receptor de NPY Y1

| | |
|---|---|
| LOCUS | A26481 2624 pb mRNA PAT 17-oct-1995 |
| DEFINICION | cDNA del gen del receptor Y1 de NPY humano. |
| ACCESO | A26481 |
| NID | g1247452 |
| VERSION | A26481.1 GI:1247452 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 2624) |
| AUTORES | - |
| TITULO | HUMAN NEUROPEPTIDE Y-Y1 RECEPTOR |
| REVISTA | Patente: WO 9309227-A 3 13 de mayo de 1993) |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |

1973
1974

PAT... MADRID
Telef.

```
source          1..2624
                /organism="Homo sapiens"
                /db_xref="taxon:9606"
CDS             152..1306
                /codon_start=1
                /product="neuropeptide Y Y1 receptor"
                /protein_id="CAA01819.1"
                /db_xref="PID:e205126"
                /db_xref="PID:g1247453"
                /db_xref="GI:1247453"
                /db_xref="SWISS-PROT:P25929"
                /translation="MNSTLFSQVENHSVHSNFSEKNAQLLAFENDDCHLPLAMIFTLA
                LAYGAVIILGVSGNLALIIIILKQKEMRNVTNILIVNLSFSDLLVAIMCLPFTFVYTL
                MDHWVFGEAMCKLNPFVQCVSITVSIFSLVLIAVERHQLIINPRGWRPNNRHAYVGIA
                VIWVLAVASSLPFLIYQVMTDEPFQNVTLDAYKDKYVCFDQFPSDSHRLSYTTLLLVL
                QYFGPLCFIFICYFKIYIRLKRRNNMMDKMRDNKYRSSETKRINIMLLSIVVAFAVCW
                LPLTIFNTVFDWNHQIIATCNHNLLFLLCHLTAMISTCVNPIFYGFLNKNFQRDLQFF
                FNFCDFRSRDDDYETIAMSTMHTDVSKTSLKQASPVAFKKINNNDDNEKI"
```

RECUENTO DE BASES 791 a, 479 c, 473 g, 878 t, 3 otras

ORIGEN

```
   1 attgttcagt tcaagggaat gaagaattca gaataatttt ggtaaatgga ttccaatatc
  61 gggaataaga ataagctgaa cagttgacct gctttgaaga aacatactgt ccatttgtct
 121 aaaataatct ataacaacca aaccaatcaa aatgaattca acattatttt cccaggttga
 181 aaatcattca gtccactcta atttcttaga gaagaatgcc cagcttctgg cttttgaaaa
 241 tgatgattgt catctgccct tggccatgat atttacctta gctcttgctt atggagctgt
 301 gatcattctt ggtgtctctg gaaacctggc cttgatcata atcatcttga aacaaaagga
 361 gatgagaaat gttaccaaca tcctgattgt gaacctttcc ttctcagact tgcttgttgc
 421 catcatgtgt ctccccttta catttgtcta cacattaatg gaccactggg tctttggtga
 481 ggcgatgtgt aagttgaatc cttttgtgca atgtgtttca atcactgtgt ccatttctc
 541 tctggttctc attgctgtgg aacgacatca gctgataatc aaccctcgag ggtggagacc
 601 aaataataga catgcttatg taggtattgc tgtgatttgg gtccttgctg tggcttcttc
 661 tttgcctttc ctgatctacc aagtaatgac tgatgagccg ttccaaaatg taacacttga
 721 tgcgtacaaa gacaaatacg tgtgctttga tcaatttcca tcggactctc ataggttgtc
 781 ttataccact ctcctcttgg tgctgcagta ttttggtcca ctttgtttta tatttatttg
 841 ctacttcaag atatatatac gcctaaaaag gagaaacaac atgatggaca agatgagaga
 901 caataagtac aggtccagtg aaaccaaaag aatcaatatc atgctgctct ccattgtggt
 961 agcatttgca gtctgctggc tccctcttac catctttaac actgtgtttg attggaatca
1021 tcagatcatt gctacctgca accacaatct gttattcctg ctctgccacc tcacagcaat
1081 gatatccact tgtgtcaacc ccatatttta tgggttcctg aacaaaaact tccagagaga
1141 cttgcagttc ttcttcaact ttgtgatttt ccggtctcgg gatgatgatt atgaaacaat
1201 agccatgtcc acgatgcaca cagatgtttc caaaacttct ttgaagcaag caagcccagt
1261 cgcatttaaa aaaatcaaca acaatgatga taatgaaaaa atctgaaact acttatagcc
1321 tatggtcccg gatgacatct gtttaaaaac aagcacaacc tgcaacatac tttgattacc
1381 tgttctccca aggaatgggg ttgaaatcat ttgaaaatga ctaagatttt cttgtcttgc

1441 tttttactg cttttgttgt agtgtcataa ttacatttgg aacaaaaggt gtgggctttg
1501 gggtcttctg gaaatagttt tgaccagaca tctttgaagt gctttttgtg aatttatgca
1561 tataatataa agacttttat actgtactta ttggaatgaa atttctttaa agtattacga
1621 tnnnctgact tcagaagtac ctgccatcca atacggtcat tagattgggt catcttgatt
1681 agattagatt agattagatt gtcaacagat tgggccatcc ttactttatg ataggcatca
1741 ttttagtgtg ttacaatagt aacagtatgc aaaagcagca ttcaggagcc gaaagatagt
1801 cttgaagtca ttcagaagtg gtttgaggtt tctgtttttt ggtggttttt gtttgttttt
1861 tttttttttc accttaaggg aggctttcat ttcctcccga ctgattgtca cttaaatcaa
1921 aatttaaaaa tgaataaaaa gacatacttc tcagctgcaa atattatgga gaattgggca
1981 cccacaggaa tgaagagaga aagcagctcc ccaacttcaa aaccattttg gtacctgaca
2041 acaagagcat tttagagtaa ttaatttaat aaagtaaatt agtattgctg caaatagcta
2101 aattatatct atttgaattg atggtcaaga gattttccat tttttttaca gactgttcag
2161 tgtttgtcaa gcttctggtc taatatgtac tcgaaagact ttccgcttac aatttgtaga
2221 aacacaaata tcgttttcca tacagcagtg cctatatagt gactgatttt aactttcaat
2281 gtccatcttt caaaggaagt aacaccaagg tacaatgtta aaggaatatt cactttacct
2341 agcagggaaa aatacacaaa aactgcagat acttcatata gcccatttta acttgtataa
2401 actgtgtgac ttgtggcgtc ttataaataa tgcactgtaa agattactga atagttgtgt
2461 catgttaatg tgcctaattt catgtatctt gtaatcatga ttgagcctca gaatcatttg
2521 gagaaactat attttaaaga acaagacata cttcaatgta ttatacagat aaagtattac
2581 atgtgtttga ttttaaaagg gcggacattt tattaaaatc aagg
```

[illegible] ADRID Telé. [illegible]

**6. Receptor de NPY Y2**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSU36269 1200 pb mRNA PRI 14-nov-1995 |
| DEFINICION | mRNA del receptor Y2 de neuropéptido Y/péptido YY humano, cd completo. |
| ACCESO | U36269 |
| NID | g1063633 |
| VERSION | U36269.1 GI:1063633 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1200) |
| AUTORES | Gerald, C., Walker, M.W., Vayssem P.J., He, C., Brancheck, T.A. y Weinshank, R.L. |
| TITULO | Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 270 (45), 26758-26761 (1995) |
| MEDLINE | 96070760 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 1200) |
| AUTORES | Gerald, C.A. |

PATRICIA [illegible] MORENO
ING [illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

TITULO Envío directo

REVISTA Enviada el 13 de septiembre de 1995. Christophe A. Gerald, Synaptic Pharmaceutical Corporation, Molecular Biology, 215 College Road, Paramus, NJ 07652, EE.UU.

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

source 1..1200

/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/clone="hhY2"
/sex="male"
/tissue_type="brain hippocampus"
/dev_stage="adult"

5'UTR 1..20

PAT... MORENO
ING... ...AN
... 113
... MADRID
Tele...

1977

```
CDS             21..1166
                /note="NPY/PYY Y2 receptor"
                /codon_start=1
                /product="neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor"
                /protein_id="AAC50281.1"
                /db_xref="PID:g1063634"
                /db_xref="GI:1063634"
                /translation="MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGPQTTPRGELVPDPEPELIDST
                KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTL
                CLPFTLTYTLMGEWKMGPVLCHLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKI
                SKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEKSIYGTV
                YSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAANDHYHQRRQKTTKMLVCVVVV
                FAVSWLPLHAFQLAVDIDSQVLDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRK
                AFLSAFRCEQRLDAIHSEVSVTFKAKKNLEVRKNSGPNDSFTEATNV"
3'UTR           1164..1200
```

RECUENTO DE BASES 292 a, 295 c, 299 g, 314 t

ORIGEN

```
   1 caagtggacc tgtactgaaa atgggtccaa taggtgcaga ggctgatgag aaccagacag
  61 tggaagaaat gaaggtggaa caatacgggc cacaaacaac tcctagaggt gaactggtcc
 121 ctgaccctga gccagagctt atagatagta ccaagctgat tgaggtacaa gttgttctca
 181 tattggccta ctgctccatc atcttgcttg ggtaattgg caactccttg gtgatccatg
 241 tggtgatcaa attcaagagc atgcgcacag taaccaactt tttcattgcc aatctggctg
 301 tggcagatct tttggtgaac actctgtgtc taccgttcac tcttacctat accttaatgg
 361 gggagtggaa aatgggtcct gtcctgtgcc acctggtgcc ctatgcccag ggcctggcag
 421 tacaagtatc cacaatcacc ttgacagtaa ttgccctgga ccggcacagg tgcatcgtct
 481 accacctaga gagcaagatc tccaagcgaa tcagcttcct gattattggc ttggcctggg
 541 gcatcagtgc cctgctggca agtcccctgg ccatcttccg ggagtattcg ctgattgaga
 601 tcatcccgga ctttgagatt gtggcctgta ctgaaaagtg gcctggcgag gagaagagca
 661 tctatggcac tgtctatagt ctttcttcct tgttgatctt gtatgttttg cctctgggca
 721 ttatatcatt ttcctacact cgcatttgga gtaaattgaa gaaccatgtc agtcctggag
 781 ctgcaaatga ccactaccat cagcgaaggc aaaaaaccac caaaatgctg gtgtgtgtgg
 841 tggtggtgtt tgcggtcagc tggctgcctc tccatgcctt ccagcttgcc gttgacattg
 901 acagccaggt cctggacctg aaggagtaca aactcatctt cacagtgttc cacatcatcg
 961 ccatgtgctc cacttttgcc aatcccctte tctatggctg gatgaacagc aactacagaa
1021 aggctttcct ctcggccttc cgctgtgagc agcggttgga tgccattcac tctgaggtgt
1081 ccgtgacatt caaggctaaa aagaacctgg aggtcagaaa gaacagtggc cccaatgact
1141 ctttcacaga ggctaccaat gtctaaggaa gctgtggtgt gaaaatgtat ggatgaattc
```

7. **Receptor de NPY Y5**

..AN
113
.ADRID
Telé.

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSU66275 1370 pb mRNA PRI 18-oct-1996 |
| DEFINICION | mRNA del receptor Y5 de neuropéptido humano (NPYR5), cd completo. |
| ACCESO | U66275 |
| NID | g1620655 |
| VERSION | U66275.1 GI:1620655 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1370) |
| AUTORES | Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., DeCarr, L.B:, Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang., P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velázquez, N. y McCaleb, M.L. |
| TITULO | Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behaviour |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 271 (42), 26315-26319 (1996) |
| MEDLINE | 96421636 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 1370) |
| AUTORES | Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., |

PILAR ... MORENO
ING ... AN
c ... nº 113
... MADRID
Telef. ...

DeCarr, L.B:, Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang., P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velázquez, N. y McCaleb, M.L.

TITULO Envío directo

REVISTA Enviada el 6 de agosto de 1996. Metabolic Disorders. Bayer Corporation, 400 Morgan Lane, West Haven, CT 06516, EE.UU.

```
CARACTERISTICAS          Localización/Cualificadores
source                   1..1370
                         /organism="Homo sapiens"
                         /db_xref="taxon:9606"
    gene                 18..1355
                         /gene="NPYR5"
    CDS                  18..1355
                         /gene="NPYR5"
                         /function="G protein-coupled receptor"
                         /codon_start=1
                         /product="neuropeptide Y5 receptor"
                         /protein_id="AAC50741.1"
                         /db_xref="PID:g1620656"
                         /db_xref="GI:1620656"
                         /translation="MDLELDEYYNKTLATENNTAATRNSDFPVWDDYKSSVDDLQYFL
                         IGLYTFVSLLGFMGNLLILMALMKKRNQKTTVNFLIGNLAFSDILVVLFCSPFTLTSV
                         LLDQWMFGKVMCHIMPFLQCVSVLVSTLILISIAIVRYHMIKHPISNNLTANHGYFLI
                         ATVWTLGFAICSPLPVFHSLVELQETFGSALLSSRYLCVESWPSDSYRIAFTISLLLV
                         QYILPLVCLTVSHTSVCRSISCGLSNKENRLEENEMINLTLHPSKKSGPQVKLSGSHK
                         WSYSFIKKHRRRYSKKTACVLPAPERPSQENHSRILPENFGSVRSQLSSSSKFIPGVP
                         TCFEIKPEENSDVHELRVKRSVTRIKKRSRSVFYRLTILILVFAVSWMPLHLFHVVTD
                         FNDNLISNRHFKLVYCICHLLGMMSCCLNPILYGFLNNGIKADLVSLIHCLHM"
```

RECUENTO DE BASES 392 a, 263 c, 257 g, 458 t

ORIGEN

MORENO
AN
113
MADRID
Teléf.

```
   1 ccaagcagga ctataatatg gatttagagc tcgacgagta ttataacaag acacttgcca
  61 cagagaataa tactgctgcc actcggaatt ctgatttccc agtctgggat gactataaaa
 121 gcagtgtaga tgacttacag tattttctga ttgggctcta tacatttgta agtcttcttg
 181 gctttatggg gaatctactt attttaatgg ctctcatgaa aaagcgtaat cagaagacta

 241 cggtaaactt cctcataggc aatctggcct tttctgatat cttggttgtg ctgttttgct
 301 cacctttcac actgacgtct gtcttgctgg atcagtggat gtttggcaaa gtcatgtgcc
 361 atattatgcc ttttcttcaa tgtgtgtcag ttttggtttc aactttaatt ttaatatcaa
 421 ttgccattgt caggtatcat atgataaaac atcccatatc taataattta acagcaaacc
 481 atggctactt tctgatagct actgtctgga cactaggttt tgccatctgt tctcccettc
 541 cagtgtttca cagtcttgtg gaacttcaag aaacatttgg ttcagcattg ctgagcagca
 601 ggtatttatg tgttgagtca tggccatctg attcatacag aattgccttt actatctctt
 661 tattgctagt tcagtatatt ctgcccttag tttgtcttac tgtaagtcat acaagtgtct
 721 gcagaagtat aagctgtgga ttgtccaaca aagaaaacag acttgaagaa aatgagatga
 781 tcaacttaac tcttcatcca tccaaaaaga gtgggcctca ggtgaaactc tctggcagcc
 841 ataaatggag ttattcattc atcaaaaaac acagaagaag atatagcaag aagacagcat
 901 gtgtgttacc tgctccagaa agaccttctc aagagaacca ctccagaata cttccagaaa
 961 actttggctc tgtaagaagt cagctctctt catccagtaa gttcatacca ggggtcccca
1021 cttgctttga gataaaacct gaagaaaatt cagatgttca tgaattgaga gtaaaacgtt
1081 ctgttacaag aataaaaaag agatctcgaa gtgttttcta cagactgacc atactgatat
1141 tagtatttgc tgttagttgg atgccactac acctttttca tgtggtaact gattttaatg
1201 acaatcttat ttcaaatagg catttcaagt tggtgtattg catttgtcat ttgttgggca
1261 tgatgtcctg ttgtcttaat ccaattctat atgggtttct taataatggg attaaagctg
1321 atttagtgtc ccttatacac tgtcttcata tgtaataatt ctcactgttt
```

## 8. VIP

| | |
|---|---|
| LOCUS | VIP 1511 pb mRNA PRI 19-mar-1999 |
| DEFINICION | mRNA del péptido intestinal vasoactivo (VIP) de Homo sapiens. |
| ACCESO | NM_003381 |
| NID | g4507896 |
| VERSION | NM_003381.1 GI:4507896 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |

MARRERO
AN
13
MADRID
Telf.

| | |
|---|---|
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1511) |
| AUTORES | DeLamarter, J.F., Buell, G.N., Kawashima, E., Polak, J.M. y Bloom, S.R. |
| TITULO | Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in bacterial cells |
| REVISTA | Peptides 6 Supl. 1, 95-102 (1985) |
| MEDLINE | 86016352 |
| COMENTARIO | REFSEQ: Esta secuencia de referencia se derivó de M36634.<br>RefSeq PROVISIONAL: Es un registro de secuencia de referencia provisional que no ha sido sujeto todavía a revisión humana. El registro de secuencia de referencia refinado final puede ser algo diferente de este. |

| CARACTERISTICAS | | Localización/Cualificadores |
|---|---|---|
| source | 1..1511 | |

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible] DRID
Tel[illegible]

```
                    /organism="Homo sapiens"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /map="6q24-q27"
                    /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene           1..1511
                    /gene="VIP"
                    /db_xref="MIM:192320"
                    /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide    67..129
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS            67..579

                    /gene="VIP"
                    /codon_start=1
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
                    /protein_id="NP_003372.1"
                    /db_xref="PID:g4507897"
                    /db_xref="GI:4507897"
                    /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                    GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                    LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                    SPDFPEELEK"
     mat_peptide    307..387
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide    439..522
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal   1326..1331
```

RECUENTO DE BASES 541 a, 255 c, 276 g, 439 t

ORIGEN

PATRICIA ... MORENO
... AN
... 113
... DRID
Tel. ...

```
   1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
  61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
 121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
 181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
 241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
 301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
 361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
 421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
 481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
 541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
 601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
 661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
 721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
 781 aatagtattt gagagttcta aatttgtcct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
 841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
 901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
 961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
1081 ataaaaagac attcttccaa aaagatttcc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1501 aaaaaaaaaa a
```

## 9. Receptor de VPAC1

LOCUS VIP 1511 pb mRNA PRI 19-mar-1999

DEFINICION mRNA del péptido intestinal vasoactivo (VIP) de Homo sapiens.

ACCESO NM_003381

NID g4507896

VERSION NM_003381.1 GI:4507896

PALABRAS CLAVE -

[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
Telé. [illegible]

1988

| | |
|---|---|
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1511) |
| AUTORES | DeLamarter, J.F., Buell, G.N., Kawashima, E., Polak, J.M. y Bloom, S.R. |
| TITULO | Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in bacterial cells |
| REVISTA | Peptides 6 Supl. 1, 95-102 (1985) |
| MEDLINE | 86016352 |
| COMENTARIO | REFSEQ: Esta secuencia de referencia se derivó de M36634.<br>RefSeq PROVISIONAL: Es un registro de secuencia de referencia provisional que no ha sido sujeto todavía a revisión humana. El registro de secuencia de referencia refinado final puede ser algo diferente de este. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1511 |

...CERO
...IAN
... 113
...ADRID
Telé...

```
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579

                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331
```

RECUENTO DE BASES 541 a, 255 c, 276 g, 439 t

ORIGEN

AN
ING
113
c
..ADRID
Telé..

```
   1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
  61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
 121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
 181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
 241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
 301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
 361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
 421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
 481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
 541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
 601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
 661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
 721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
 781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
 841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
 901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
 961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
1081 ataaaaagac attcttccaa aaagattttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1501 aaaaaaaaaa a
```

## 10. Receptor de VPAC2

LOCUS HUMHVRP 1640 pb mRNA PRI 16-feb-1995

DEFINICION mRNA del receptor de VIP con preferencia por helodermina humano (receptor VIP2/PACAP)

ACCESO L36566

NID g550477

VERSION L36566.1 GI:550477

AN
113
ADRID

| | |
|---|---|
| PALABRAS CLAVE | Receptor de PACAP, receptor de VIP, receptor de VIP con preferencia por helodermina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1640) |
| AUTORES | Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., J., Goosens, J.F., De Neef, P., Waelbroeck, M., y Robberecht, P. |
| TITULO | Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts |
| REVISTA | Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (3), 1617-1624 (1994) |
| MEDLINE | 95110300 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1640 |

1988

PATRICIA [illegible] MORENO
MO[illegible] Y AL[illegible]MAN
[illegible] 113
[illegible] ADRID
Telf: [illegible]

```
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_line="SUP T1 lymphoblast"
                     /clone_lib="lamda ZAP II"
     sig_peptide     163..231
                     /note="putative; putative"
     CDS             163..1479
                     /note="human VIP2 receptor was previously called
                     'helodermin-preferring VIP receptor'; transmembrane
                     domains are located at positions: 637-696; 772-844;
                     880-948; 1003-1071; 1147-1209; 1243-1302.; Potential
                     glycosylation sites are located at :334-336; 424-426;
                     436-438."
                     /codon_start=1
                     /function="VIP and PACAP receptor"
                     /protein_id="AAC37569.1"
                     /db_xref="PID:g550478"
                     /db_xref="GI:550478"
                     /translation="MRTLLPPALLTCWLLAPVNSIHPECRFHLEIQEEETKCTELLRS
                     QTEKHKACSGVWDNITCWRPANVGETVTVPCPKVFSNFYSKAGNISKNCTSDGWSETF
                     PDFVDACGYSDPEDESKITFYILVKAIYTLGYSVSLMSLATGSIILCLFRKLHCTRNY
                     IHLNLFLSFILRAISVLVKDDVLYSSSGTLHCPDQPSSWVGCKLSLVFLQYCIMANFF


                     WLLVEGLYLHTLLVAMLPPRRCFLAYLLIGWGLPTVCIGAWTAARLYLEDTGCWDTND
                     HSVPWWVIRIPILISIIVNFVLFISIIRILLQKLTSPDVGGNDQSQYKRLAKSTLLLI
                     PLFGVHYMVFAVFPISISSKYQILFELCLGSFQGLVVAVLYCFLNSEVQCELKRKWRS
                     RCPTPSASRDYRVCGSSFSHNGSEGALQFHRASRAQSFLQTETSVI"
     mat_peptide     232..1476
                     /function="VIP and PACAP receptor"
```

RECUENTO DE BASES 315 a, 512 c, 461 g, 352 t

ADRID

1989

ORIGEN

```
   1 cgggacgagg gggcggcccc cgcgctcggg gcgctcggct acagctgcgg ggcccgaggt
  61 ctccgcgcac tcgctcccgg cccatgctgg aggcggcgga acccggggga cctaggacgg
 121 aggcggcggg cgctgggcgg cccccggcac gctgagctcg ggatgcggac gctgctgcct
 181 cccgcgctgc tgacctgctg gctgctcgcc cccgtgaaca gcattcaccc agaatgccga
 241 tttcatctgg aaatacagga ggaagaaaca aaatgtacag agcttctgag gtctcaaaca
 301 gaaaaacaca aagcctgcag tggcgtctgg gacaacatca cgtgctggcg gcctgccaat
 361 gtgggagaga ccgtcacggt gccctgccca aaagtcttca gcaattttta cagcaaagca
 421 ggaaacataa gcaaaaactg tacgagtgac ggatggtcag agacgttccc agatttcgtc
 481 gatgcctgtg gctacagcga cccggaggat gagagcaaga tcacgtttta tattctggtg
 541 aaggccattt ataccctggg ctacagtgtc tctctgatgt ctcttgcaac aggaagcata
 601 attctgtgcc tcttcaggaa gctgcactgc accaggaatt acatccacct gaacctgttc
 661 ctgtccttca tcctgagagc catctcagtg ctggtcaagg acgacgttct ctactccagc
 721 tctggcacgt tgcactgccc tgaccagcca tcctcctggg tgggctgcaa gctgagcctg
 781 gtcttcctgc agtactgcat catggccaac ttcttctggc tgctggtgga ggggctctac
 841 ctccacaccc tcctggtggc catgctcccc cctagaaggt gcttcctggc ctacctcctg
 901 atcggatggg gcctccccac cgtctgcatc ggtgcatgga ctgcggccag gctctactta
 961 gaagacaccg gttgctggga tacaaacgac cacagtgtgc cctggtgggt catacgaata
1021 ccgattttaa tttccatcat cgtcaatttt gtccttttca ttagtattat acgaattttg
1081 ctgcagaagt taacatcccc agatgtcggc ggcaacgacc agtctcagta caagaggctg
1141 gccaagtcca cgctcctgct tatcccgctg ttcggcgtcc actacatggt gtttgccgtg
1201 tttcccatca gcatctcctc caaataccag atactgtttg agctgtgcct cgggtcgttc
1261 cagggcctgg tggtggccgt cctctactgt ttcctgaaca gtgaggtgca gtgcgagctg
1321 aagcgaaaat ggcgaagccg gtgcccgacc ccgtccgcga gccgggatta cagggtctgc
1381 ggttcctcct tctcccacaa cggctcggag ggcgccctgc agttccaccg cgcgtcccga
1441 gcccagtcct tcctgcaaac ggagacctcg gtcatctagc cccacccctg cctgtcggac
1501 gcggcgggag gcccacggtt cggggcttct gcggggctga gacgccggct tcctccttcc
1561 agatgccgga gcaccgtgtc gggcaggtca gcgcggtcct gactccgtca agctggttgt
1621 ccactaaacc ccatacctgg
```

PAT[illegible] MORENO
ING[illegible] Y [illegible]MAN
c [illegible], 113
[illegible] MADRID
Telé[illegible]

## ABREVIATURAS

FSD = disfunción sexual femenina

FSAD = trastorno de la excitación sexual femenina

cAMP = 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico

cGMP = 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico

$P_{cAMP}$ = potenciador de cAMP

$P_{cGMP}$ = potenciador de cGMP

$A_{cAMP}$ = activador de cAMP

$A_{cGMP}$ = activador de cGMP

$AM_{cAMP}$ = modulador adverso de cAMP

$AM_{cGMP}$ = modulador adverso de cGMP

$I_{cAMP}$ = inhibidor de cAMP
$I_{cGMP}$ = inhibidor de cGMP
$I:I_{cAMP}$ = inhibidor de un inhibidor de cAMP
$I:I_{cGMP}$ = inhibidor de un inhibidor de cGMP
$I:AM_{cAMP}$ = inhibidor de un modulador adverso de cAMP
$I:AM_{cGMP}$ = inhibidor de un modulador adverso de cGMP
$U:A_{cAMP}$ = sobrerregulador de un activador de cAMP
$U:A_{cGMP}$ = sobrerregulador de un activador de cGMP

MORENO
MAN
113
ADRID

AC = adenilato ciclasa

A:AC = activador de AC

NEP = endopeptidasa neutra

I:NEP = inhibidor de NEP

VIP = péptido intestinal vasoactivo

VIPr = receptor de VIP (puede expresarse como VIPR)

$VIP_n$ = receptor de un subtipo de VIP (tal como VIPR1, VIPR2)

A:VIPr = activador de VIPr

A:$VIP_n$ = activador de $VIP_n$

I:VIPr = inhibidor de VIPr

I:$VIP_n$ = inhibidor de $VIP_n$

I:I:VIPr = inhibidor de un inhibidor de VIPr

I:I:$VIP_n$ = inhibidor de un inhibidor de $VIP_n$

PDE = fosfodiesterasa

PDEn = familia de las PDE (por ejemplo PDE1, PDE2, etc.)

$PDE_{cAMP}$ = PDE hidrolizante de cAMP

$PDE_{cGMP}$ = PDE hidrolizante de cGMP

I:PDE = inhibidor de una PDE

I:$PDE_{cAMP}$ = inhibidor de una PDE hidrolizante de cAMP

I:$PDE_{cAMP}$ = inhibidor de una familia de PDE

MORENO
AN
113
ADRID

hidrolizante de cAMP

NPY = neuropéptido Y

NPYr = receptor de NPY (puede expresarse como NPYR)

NPY $Y_n$ = subtipo de receptor $Y_n$ de NPY (por ejemplo NPY $Y_1$) (por ejemplo NPYR1)

I:NPY = inhibidor de NPY

I:NPY $Y_n$ = inhibidor de NPY $Y_n$

kDa = kilodalton

pb = par de bases

kb = kilopar de bases

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telé: [illegible]

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el agente es un mediador de la vasorrelajación genital (por ejemplo vaginal o clitorídea).

3. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la composición es para administración oral.

4. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el citado cAMP es cAMP endógeno.

5. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición se

MORENO
MAN
113
DRID

administra antes o durante la estimulación sexual.

6. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD.

7. El uso según la reivindicación 6, en el que el agente es un mediador de la vasorrelajación genital (por ejemplo vaginal o clitorídea).

8. El uso según las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el medicamento es para administración oral.

9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el citado cAMP es cAMP endógeno.

10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la composición se administra antes o durante la estimulación sexual.

11. Un procedimiento de tratamiento de una hembra (tal como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un

PATENTES ... MORENO
ING ... 113
Teléf. ... MADRID

agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. Un procedimiento según la reivindicación 11 en el que el agente es un mediador de la vasorrelajación genital (por ejemplo vaginal o clitorídea).

13. Un procedimiento según las reivindicaciones 11 o 12, en el que el agente se administra oralmente.

14. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el citado cAMP es cAMP endógeno.

15. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en la que la composición se administra antes o durante la estimulación sexual.

16. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar

PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] MAN
[illegible] 113
[illegible]RID
Tel [illegible]

si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD.

17. Un procedimiento que comprende las etapas de:

(a) realizar el ensayo según la reivindicación 16.

(b) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente el cAMP, y

(c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados.

18. Un procedimiento de tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, por potenciación de cAMP in vivo con un agente,

siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente el cAMP en un procedimiento de ensayo in vitro,
siendo el procedimiento de ensayo in vitro el procedimiento de ensayo definido en la reivindicación 16.

[illegible] ..ADRID
Telé.: [illegible]

19. El uso de un agente en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente el cAMP cuando se ensaya in vitro mediante un procedimiento de ensayo según la reivindicación 16.

20. Un agente identificado por el procedimiento de ensayo según la reivindicación 16.

21. Un agente según la reivindicación 20 para uso en medicina.

22. Un agente según la reivindicación 21 para uso en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD.

23. Un medicamento de administración oral para tratar la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el medicamento el agente según la reivindicación 20.

24. Un procedimiento de diagnóstico, comprendiendo el procedimiento aislar una muestra de una hembra, determinar si la muestra contiene una entidad presente en una cantidad tal que produzca FSD, preferiblemente FSAD, o si está en una cantidad como para producir FSD, preferiblemente FSAD,

PATRICIA [illegible] MORENO
INGLÉS Y ALEMÁN
[illegible]
MADRID
Tel. [illegible]

teniendo la entidad un efecto directo o indirecto sobre el nivel o la actividad de cAMP en los genitales sexuales de la hembra.

25. Una composición o estuche de diagnóstico que comprende medios para detectar una entidad en una muestra aislada de una hembra, pudiendo utilizarse los medios para determinar si la muestra contiene la entidad presente en una cantidad tal que produzca FSD, preferiblemente FSAD, o si está en una cantidad como para producir FSD, preferiblemente FSAD, teniendo la entidad un efecto directo o indirecto sobre el nivel o la actividad del cAMP en los genitales sexuales de la hembra.

26. Un modelo animal utilizado para identificar agentes capaces de tratar la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el citado modelo un animal hembra anestesiado, incluyendo los medios para medir los cambios del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo) del citado animal a continuación de la estimulación del nervio pélvico de éste.

27. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente el cAMP para tratar la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el

[illegible] MORENO
AN
RID
Tel.

1999/2000

procedimiento de ensayo: administrar un agente al modelo animal de la reivindicación 26, y medir cualquier potenciación de cAMP y/o aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo) del citado animal.

28. Un agente identificado por el procedimiento de ensayo de la reivindicación 27.

29. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente; estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; y siendo el citado agente uno o más de: un I:PDE, un I:NEP, un I:NPY.

30. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD (preferiblemente FSAD); y siendo el citado agente uno o más de: un I:PDE, un I:NEP, un I:NPY.

31. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD); comprendiendo el

PAT. MORENO AN RID

procedimiento suministrar a la hembra un agente; estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; y siendo el citado agente uno o más de: un I:PDE, un I:NEP, un I:NPY.

32. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo); comprendiendo la composición farmacéutica un agente; estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; y siendo el citado agente uno o más de: un I:PDE, un I:NEP, un I:NPY.

33. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para estimular el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo); y siendo el citado agente uno o más de: un I:PDE, un I:NEP, un I:NPY.

34. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD); comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente; siendo el citado agente uno o más de: un I:PDE, un I:NEP, un I:NPY.

35. La invención según una cualquiera de las

PAT... MORENO
...MAN
... 113
... DRID
TEL...

reivindicaciones 29 a 34, en la que el citado agente potencia el cAMP.

36. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el citado cAMP es cAMP endógeno (como se ha definido en la presente).

...MORENO
...AN
...13
...DRID
Telé.

2002

# PRODUCTO FARMACEUTICO

## RESUMEN

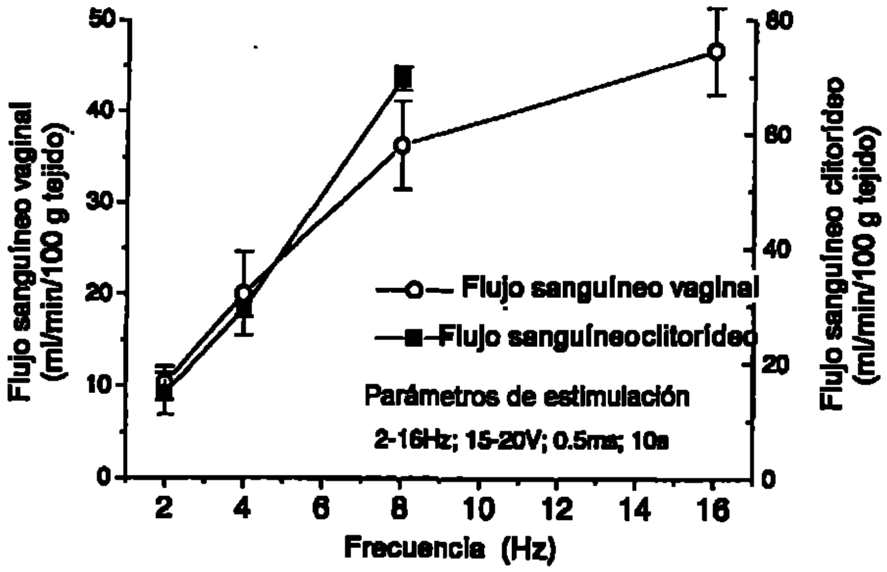
Se describe un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular del FSAD. El procedimiento comprende suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad tal que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra. El agente puede mezclarse con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

AN
A ,RID
Tel.

2003

Figura 1

Flujo sanguíneo genital. Relación de respuesta a la frecuencia entre la estimulación del nervio pélvico y el flujo sanguíneo



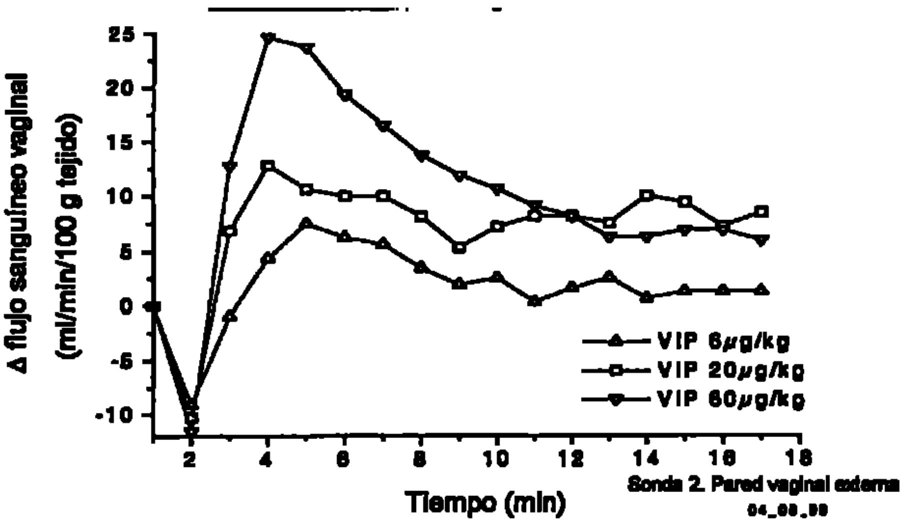
[illegible] MORENO
[illegible] SAN
[illegible] 13
[illegible] MADRID
Teléf. [illegible]

2004 ~~2005~~

## Figura 2

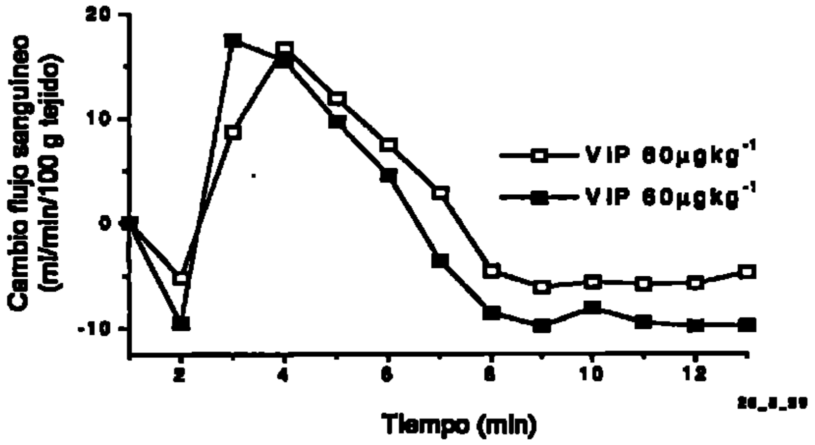
## Efecto de VIP en el flujo sanguíneo vaginal

a



## Efectos de infusiones repetidas de VIP sobre el flujo sanguíneo vaginal

b

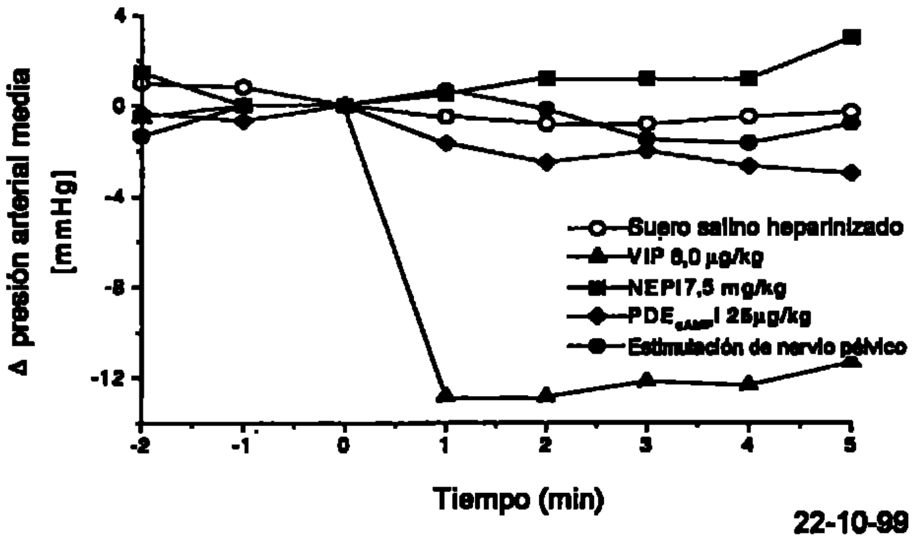


2b

[illegible] MORENO [illegible] DRID

Figura 3

Efecto de VIP, de un inhibidor de NEP, de un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ o de la estimulación del nervio pélvico sobre la presión arterial media en conejo anestesiado

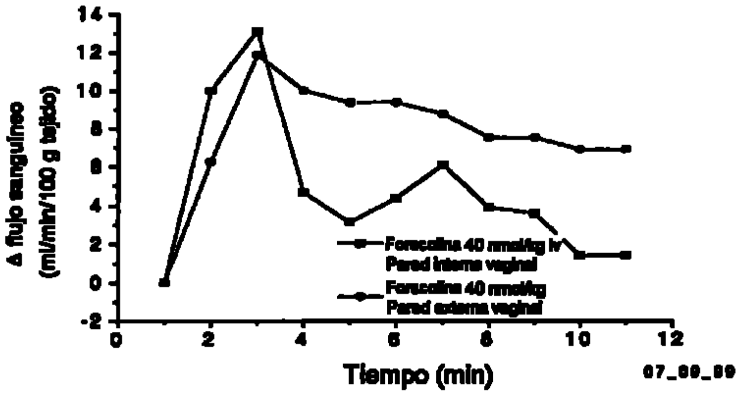


22-10-99

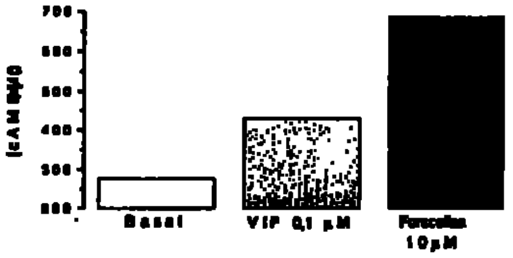
113
MADRID

Figura 4

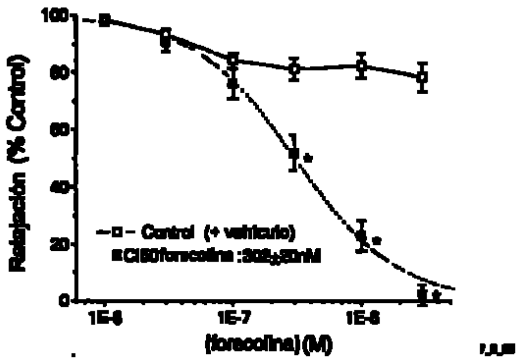
4a) La forscolina (un mimético de cAMP) aumenta el flujo sanguíneo vaginal en conejo anestesiado



4b) VIP estimula la producción de cAMP en vagina de conejo aislada



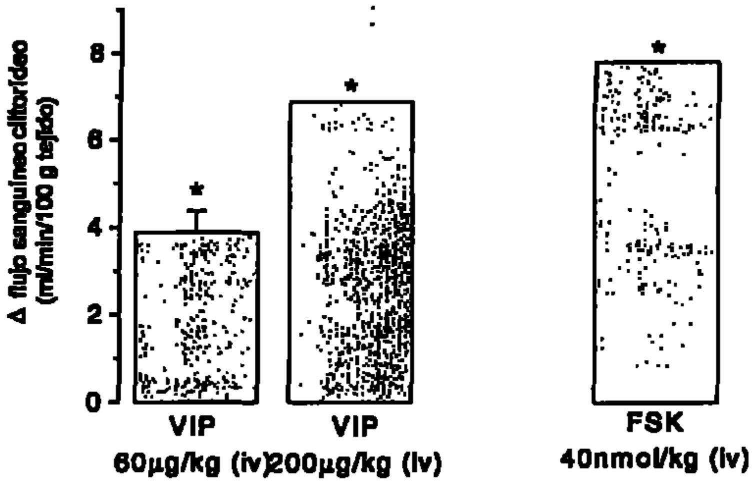
4c) Efecto relajante de la forscolina (un mimético de cAMP) sobre vagina de conejo aislada



PATENTES ... MARRERO
ING ... AN
... 113
... MADRID
Teléf...

## Figura 5

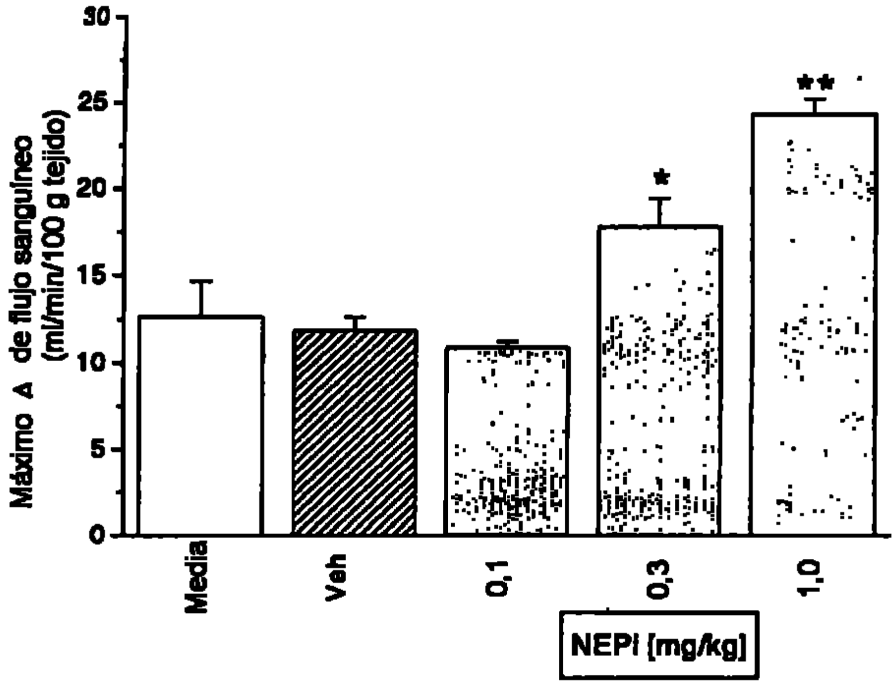
VIP y forscolina (un mimético de cAMP) aumentan el flujo sanguíneo clitorídeo en conejo anestesiado



PATRICIA ... MORENO
ING ... MAN
... 113
... RID
Telf.

Figura 6

Efecto de un inhibidor de NEP sobre los cambios por estimulación del nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal de conejo anestesiado

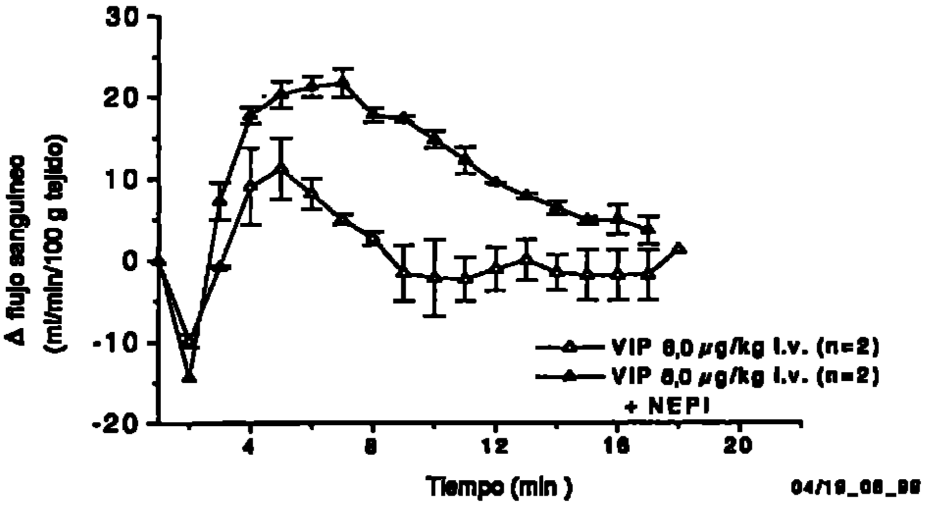


MADRID

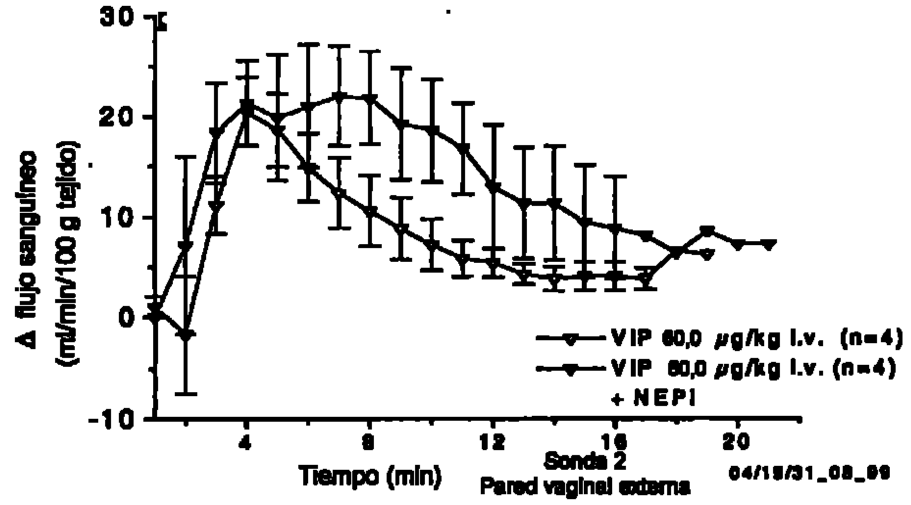
2009

Figura 7

Efecto de VIP (6 µg/kg) sobre el flujo sanguíneo vaginal en presencia y ausencia de un inhibidor de NEP



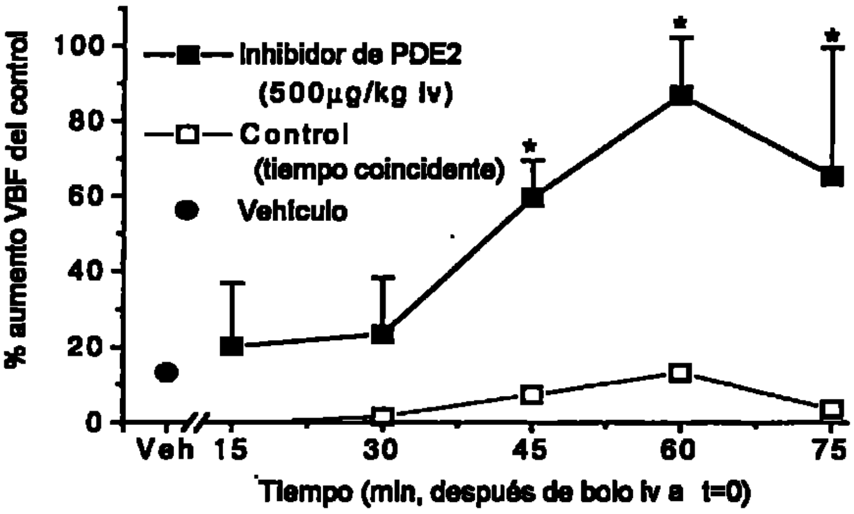
Efecto de VIP (60 µg/kg) sobre el flujo sanguíneo vaginal en presencia y ausencia de un inhibidor de NEP



PATENT... MORENO
...AN
...RID
Teléf.

Figura 8

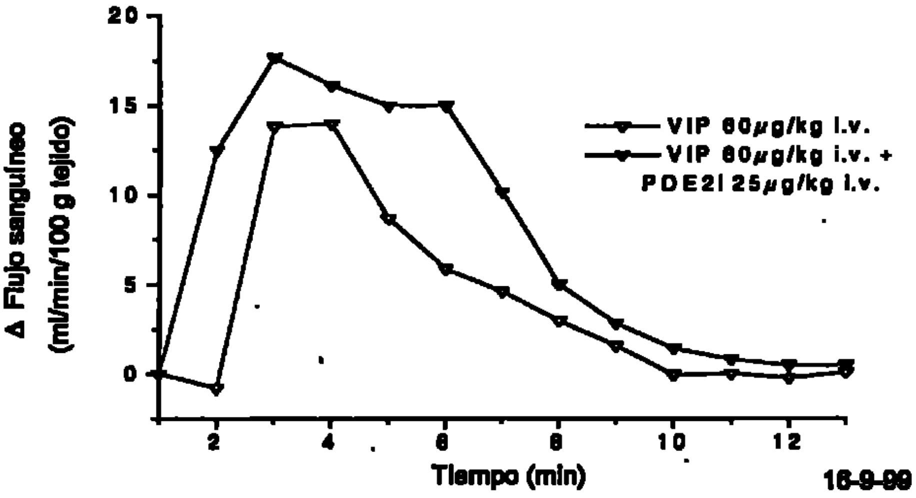
Efecto de un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 sobre los aumentos por estimulación del nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal



[illegible] RID
Te: [illegible]

Figura 9

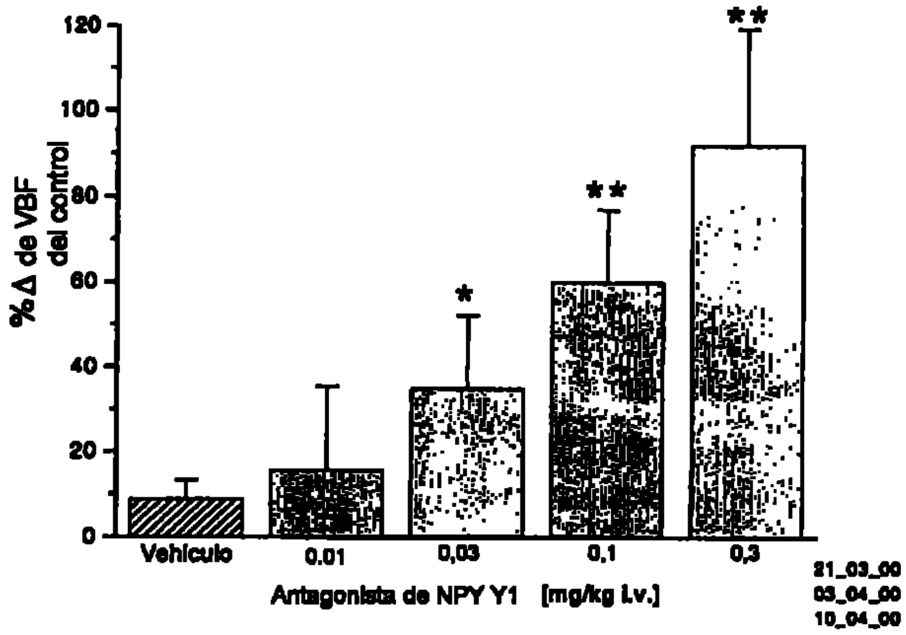
Efecto de un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 sobre los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal



[illegible] MORENO
AN
[illegible]
Telé [illegible] MADRID

Figura 10

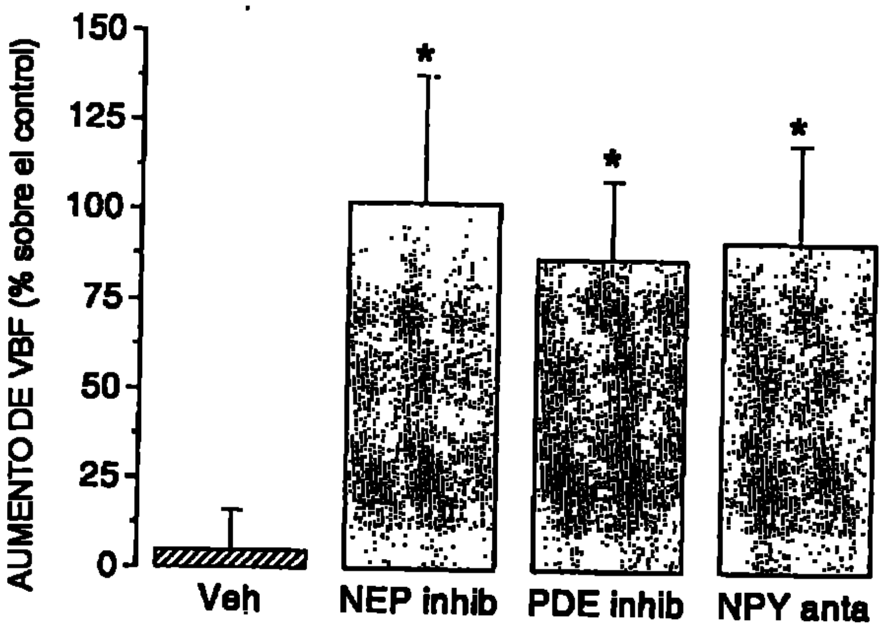
Efecto del antagonista de NPY Y1 sobre los aumentos por estimulación del nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal



PATRICIA [illegible] MORENO
[illegible] AN
113
MADRID
Telé

Figura 11

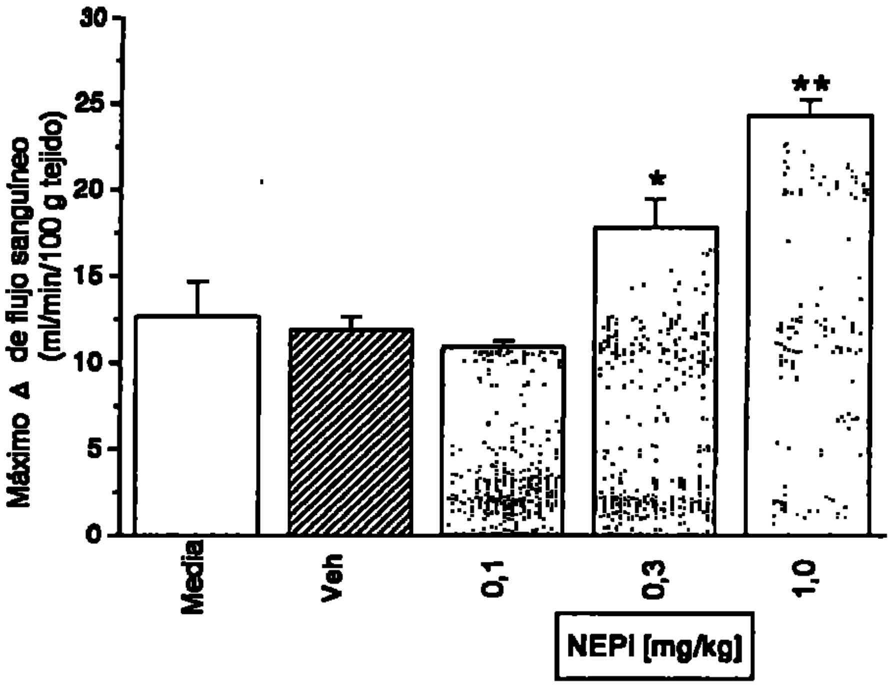
La estimulación de la señalización de cAMP potencia los aumentos mediados por el nervio del flujo sanguíneo vaginal (VBF) en conejo



PAT[illegible] MORENO
[illegible] AN
[illegible] 113
[illegible] MADRID
Telé. [illegible]

Figura 12

Efecto de un inhibidor de NEP sobre los cambios por estimulación del nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal de conejo anestesiado



PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

Doña PATRICIA KOCH MORENO, intérprete jurado de inglés y alemán, certifica que la adjunta es traducción fiel y completa al español del documento adjunto redactado en inglés.

En Madrid, a **25 OCT 2000**

PATRICIA KOCH MORENO
INGLES Y ALEMAN
c/. Cartagena, 113
Teléf. 519 59 90 - MADRID

PCS10343APROVS

2016

INVESTOR IN PEOPLE

The Patent Office
Concept House
Cardiff Road
Newport
South Wales
NP10 8QQ

I, the undersigned, being an officer duly authorised in accordance with Section 74(1) and (4) of the Deregulation & Contracting Out Act 1994, to sign and issue certificates on behalf of the Comptroller-General, hereby certify that annexed hereto is a true copy of the documents as originally filed in connection with the patent application identified therein.

In accordance with the Patents (Companies Re-registration) Rules 1982, if a company named in this certificate and any accompanying documents has re-registered under the Companies Act 1980 with the same name as that with which it was registered immediately before re-registration save for the substitution as, or inclusion as, the last part of the name of the words "public limited company" or their equivalents in Welsh, references to the name of the company in this certificate and any accompanying documents shall be treated as references to the name with which it is so re-registered.

In accordance with the rules, the words "public limited company" may be replaced by p.l.c., plc, P.L.C. or PLC.

Re-registration under the Companies Act does not constitute a new legal entity but merely subjects the company to certain additional company law rules.

Signed R. Mahoney

Dated 02 August 2000

Patents Form 1/77

Patents Act 1977
(Rule 16)

The Patent Office

2017

& CO

# Request for a grant of a patent

*(See the notes on the back of this form you can also get an explanatory leaflet from the Patent Office to help you fill in this form)*

THE PATENT OFFICE
12 JUL 2000
RECEIVED BY HAND

13JUL00 E552487-8 002246
P01/7700 0.00-00171[illegible]

The Patent Office
Cardiff Road
Newport
Gwent NP9 1RH

1. Your reference — P009412GB CTH

2. Patent application number *(The Patent Office will fill in this part)* — **0017141.3** — 12 JUL 2000

3. Full name, address and postcode of the or of each applicant *(underline all surnames)*

Pfizer Limited
Ramsgate Road
Sandwich
Kent
CT13 9NJ

X Patents ADP number *(if you know it)* 6892673001

If the applicant is a corporate body, give the country/state of its incorporation — United Kingdom

4. Title of the invention — PHARMACEUTICAL

5. Name of your agent *(if you have one)* — D YOUNG & CO

"Address for service" in the United Kingdom to which all correspondence should be sent (including the postcode)

21 NEW FETTER LANE
LONDON
EC4A 1DA

X Patents ADP number *(if you know it)* — 59006 ✓

6. If you are declaring priority from one or more earlier patent applications, give the country and date of filing of the or each of these earlier applications and *(if you know it)* the or each application number

| | Country | Priority application number *(if you know it)* | Date of filing *(day/month/year)* |
|---|---|---|---|
| 1st | | | |
| 2nd | | | |
| 3rd | | | |

7. If this application is divided or otherwise derived from an earlier UK application, give the number and filing date of the earlier application

| Number of earlier application | Date of filing (day/month/year) |
|---|---|
| | |

8. **Is a statment of inventorship and of right to grant of a patent required in support of this request?** *(Answer 'Yes' if:*
*a) any applicant named in part 3 is not an inventor, or*
*b) there is an inventor who is not named as an applicant, or*
*c) any named applicant is a corporate body.*
*See note (d))*

YES

| | | |
|---|---|---|
| 9. Enter the number of sheets for any of the following items you are filing with this form. Do not count copies of the same document | Continuation sheets of this form | 0 |
| | Description | 205 (Inc Seq. Listings) |
| | Claim(s) | 5 |
| | Abstract | 1 |
| | Drawing(s) | 12 |
| 10. If you are also filing any of the following, state how many against each item | Priority Documents | 0 |
| | Translation of Priority Documents | 0 |
| | Statment of inventorship and right to grant of a patent *(Patents Form 7/77)* | 0 |
| | Request for preliminary examination and search *(Patents Form 9/77)* | 0 |
| | Request for substantive examination *(Patents Form 10/77)* | 0 |
| | Any other documents *(Please specify)* | 0 |

11. I/We request the grant of a Patent on the basis of this application.

| Signature | Date |
|---|---|
| **D YOUNG & CO**<br>Agents for the Applicants | 12 Jul 2000 |

12. Name and daytime telephone number of person to contact in the United Kingdom — Charles Harding — 023 80634816

**Warning**
*After an application for a patent has been filed, the Comptroller of the Patent Office will consider whether publication or communication of the invention should be prohibited or restricted under Section 22 of the Patents Act 1977. You will be informed if it is necessary to prohibit or restrict your invention in this way. Furthermore, if you live in the United Kingdom, Section 23 of the Patents Act 1977 stops you from applying for a patent abroad without first getting written permission from the Patent Office unless an application has been filed at least 6 weeks beforehand in the United Kingdom for a patent for the same invention and either no direction prohibiting publication or communication has been given, or any such direction has been revoked.*

**Notes**
*a) If you need help to fill in this form or you have any questions, please contact the Patent Office on 01645 500505.*

*b) Write your answers in capital letters using black ink or you may type them.*

*c) If there is not enough space for all the relevant details on any part of this form, please continue on a separate sheet of paper and write "see continuation sheet" in the relevant part(s). Any continuation sheets should be attached to this form.*

*d) If you answered 'Yes' Patents Form 7/77 will need to be filed.*

*e) Once you have filled in the form you must remember to sign and date it.*

*f) For details of the fee and ways to pay please contact the Patent Office.*

2018

# PHARMACEUTICAL

## FIELD OF INVENTION

The present invention relates to a pharmaceutical that is useful for the treatment of female sexual dysfunction (FSD), in particular female sexual arousal dysfunction (FSAD).

The present invention also relates to a method of treatment of FSD, in particular FSAD.

The present invention also relates to assays to screen for compounds useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

For convenience, a list of abbreviations that are used in the following text is presented before the Claims section.

## FEMALE SEXUAL RESPONSE

The female sexual response phase of arousal is not easily distinguished from the phase of desire until physiological changes begin to take place in the vagina and clitoris as well as other sexual organs. Sexual excitement and pleasure are accompanied by a combination of vascular and neuromuscular events which lead to engorgement of the clitoris, labia and vaginal wall, increased vaginal lubrication and dilatation of the vaginal lumen (Levin, 1980; Ottesen, 1983; Levin, 1991; Levin, 1992; Sjoberg, 1992; Wagner, 1992; Schiavi *et al.*, 1995; Masters *et al.*, 1996; Berman *et al.*, 1999).

Vaginal engorgement enables transudation to occur and this process is responsible for increased vaginal lubrication. Transudation allows a flow of plasma through the epithelium and onto the vaginal surface, the driving force for which is increased blood flow in the vaginal capillary bed during the aroused state. In addition engorgement leads to an increase in vaginal length and luminal diameter, especially in the distal 2/3 of the vaginal canal. The luminal dilatation of the vagina is due to a combination of smooth muscle relaxation of its wall and skeletal muscle relaxation of the pelvic floor muscles. Some sexual pain disorders such as vaginismus are thought to be due, at least in part, by inadequate relaxation preventing dilatation of the vagina; it

has yet to be ascertained if this is primarily a smooth or skeletal muscle problem. (Levin, 1980; Ottesen, 1983; Levin, 1991; Levin, 1992; Sjoberg, 1992; Wagner, 1992; Schiavi *et al.*, 1995; Master *et al.*, 1996; Berman *et al.*, 1999).

The vasculature and micro vasculature of the vagina are innervated by nerves containing neuropeptides and other neurotransmitter candidates. These include calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NPY), nitric oxide synthase (NOS), substance P and vasoactive intestinal peptide (VIP) (Hoyle *et al.*, 1996). Peptides that are present in the clitoris are discussed *infra*. Nitric oxide synthase, which is often colocalised with VIP, displays a greater expression, immunologically, in the deep arteries and veins rather than in the blood vessels of the propria (Hoyle *et al.*, 1996).

## FEMALE SEXUAL DYSFUNCTION

It is known that some individuals can suffer from female sexual dysfunction (FSD).

FSD is best defined as the difficulty or inability of a woman to find satisfaction in sexual expression. FSD is a collective term for several diverse female sexual disorders (Leiblum, 1998, Berman *et al.*, 1999). The woman may have lack of desire, difficulty with arousal or orgasm, pain with intercourse or a combination of these problems. Several types of disease, medications, injuries or psychological problems can cause FSD.

Studies investigating sexual dysfunction in couples reveals that up to 76% of women have complaints of sexual dysfunction and that 30-50% of women in the USA experience FSD.

Sub-types of FSD include hypoactive sexual desire disorder, sexual arousal disorder, orgasmic disorder and sexual desire disorder.

Treatments in development are targeted to treat specific subtypes of FSD, predominantly desire and arousal disorders.

2019

2020

The categories of FSD are best defined by contrasting them to the phases of normal female sexual response: desire, arousal and orgasm (Leiblum 1998). Desire or libido is the drive for sexual expression – and manifestations often include sexual thoughts either when in the company of an interested partner or when exposed to other erotic stimuli. In contrast, sexual arousal is the vascular response to sexual stimulation, an important component of which is vaginal lubrication and elongation of the vagina. Thus, sexual arousal, in contrast to sexual desire, is a response relating to genital (e.g. vaginal and clitoral) blood flow and not necessarily sensitivity. Orgasm is the release of sexual tension that has culminated during arousal.

Hence, FSD typically occurs when a woman has an inadequate or unsatisfactory response in any of these phases, usually desire, arousal or orgasm. FSD categories include hypoactive sexual desire disorder, sexual arousal disorder, orgasmic disorders and sexual pain disorders.

Hypoactive sexual desire disorder is present if a woman has no or little desire to be sexual, and has no or few sexual thoughts or fantasies. This type of FSD can be caused by low testosterone levels, due either to natural menopause or to surgical menopause. Other causes include illness, medications, fatigue, depression and anxiety.

Female sexual arousal disorder (FSAD) is characterised by inadequate genital response to sexual stimulation. The genitalia (e.g. the vagina and/or the clitoris) do not undergo the engorgement that characterises normal sexual arousal. The vaginal walls are poorly lubricated, so that intercourse is painful. Orgasms may be impeded. Arousal disorder can be caused by reduced oestrogen at menopause or after childbirth and during lactation, as well as by illnesses, with vascular components such as diabetes and atherosclerosis. Other causes result from treatment with diuretics, antihistamines, antidepressants eg SSRIs or antihypertensive agents. FSAD is discussed in more detail *infra*.

Sexual pain disorders (which include dyspareunia and vaginismus) are characterised by pain resulting from penetration and may be caused by medications which reduce lubrication, endometriosis, pelvic inflammatory disease, inflammatory bowel disease or urinary tract problems.

The prevalence of FSD is difficult to gauge because the term covers several types of problem, some of which are difficult to measure, and because the interest in treating FSD is relatively recent. Many women's sexual problems are associated either directly with the female ageing process or with chronic illnesses such as diabetes and hypertension.

There are wide variations in the reported incidence and prevalence of FSD, in part explained by the use of differing evaluation criteria, but most investigators report that a significant proportion of otherwise healthy women have symptoms of one or more of the FSD subgroups. By way of example, studies comparing sexual dysfunction in couples reveal that 63% of women had arousal or orgasmic dysfunction compared with 40% of men have erectile or ejaculatory dysfunction (Frank *et al.*, 1978).

However, the prevalence of female sexual arousal disorder varies considerably from survey to survey. In a recent National Health and Social Life Survey 19% of women reported lubrication difficulties whereas 14% of women in an outpatient gynaecological clinic reported similar difficulties with lubrication (Rosen *et al.*, 1993).

Several studies have also reported dysfunction with sexual arousal in diabetic women (up to 47%), this included reduced vaginal lubrication (Wincze *et al.*, 1993). There was no association between neuropathy and sexual dysfunction.

Numerous studies have also shown that between 11-48% of women overall may have reduced sexual desire with age. Similarly, between 11-50% of women report problems with arousal and lubrication, and therefore experience pain with intercourse. Vaginismus is far less common, affecting approximately 1% of women.

Studies of sexually experienced women have detailed that 5-10% have primary anorgasmia. Another 10% have infrequent orgasms and a further 10% experience them inconsistently (Spector *et al.*, 1990).

Because FSD consists of several subtypes that express symptoms in separate phases of the sexual response cycle, there is not a single therapy. Current treatment of FSD focuses principally on psychological or relationship issues. Treatment of FSD is gradually evolving as more clinical and basic science studies are dedicated to the investigation of this medical problem. Female sexual complaints are not all psychological in pathophysiology, especially for those individuals who may have a

2020

component of vasculogenic dysfunction (eg FSAD) contributing to the overall female sexual complaint. There are at present no drugs licensed for the treatment of FSD. Empirical drug therapy includes oestrogen administration (topically or as hormone replacement therapy), androgens or mood-altering drugs such as buspirone or trazodone. These treatment options are often unsatisfactory due to low efficacy or unacceptable side effects.

Since interest is relatively recent in treating FSD pharmacologically, therapy consists of the following:- psychological counselling, over-the-counter sexual lubricants, and investigational candidates, including drugs approved for other conditions. These medications consist of hormonal agents, either testosterone or combinations of oestrogen and testosterone and more recently vascular drugs, that have proved effective in male erectile dysfunction. None of these agents has been demonstrated to be very effective in treating FSD.

## FEMALE SEXUAL AROUSAL DISORDER (FSAD)

The sexual arousal response consists of vasocongestion in the pelvis, vaginal lubrication and expansion and swelling of the external genitalia. The disturbance causes marked distress and/or interpersonal difficulty. Studies investigating sexual dysfunction in couples reveals that there is a large number of females who suffer from sexual arousal dysfunction; otherwise known as female sexual arousal disorder (FSAD).

The Diagnostic and Statistical Manual (DSM) IV of the American Psychiatric Association defines Female Sexual Arousal Disorder (FSAD) as being:

> *"a persistent or recurrent inability to attain or to maintain until completion of the sexual activity adequate lubrication-swelling response of sexual excitement. The disturbance must cause marked distress or interpersonal difficulty."*

FSAD is a highly prevalent sexual disorder affecting pre-, peri- and post menopausal (±HRT) women. It is associated with concomitant disorders such as depression, cardiovascular diseases, diabetes and UG disorders.

The primary consequences of FSAD are lack of engorgement/swelling, lack of lubrication and lack of pleasurable genital sensation. The secondary consequences of FSAD are reduced sexual desire, pain during intercourse and difficulty in achieving an orgasm.

It has recently been hypothesised that there is a vascular basis for at least a proportion of patients with symptoms of FSAD (Goldstein *et al.*, 1998) with animal data supporting this view (Park *et al.*, 1997).

Drug candidates for treating FSAD, which are under investigation for efficacy, are primarily erectile dysfunction therapies that promote circulation to the male genitalia. They consist of two types of formulation, oral or sublingual medications (Apomorphine, Phentolamine, Sildenafil), and prostaglandin ($PGE_1$ - Alprostadil) that are injected or administered transurethrally in men, and topically to the genitalia in women.

The present invention seeks to provide an effective means of treating FSD, and in particular FSAD.

## SUMMARY ASPECTS OF THE PRESENT INVENTION

The present invention is based on findings that FSAD is associated with reduced genital blood flow – in particular reduced blood flow in the vagina and/or the clitoris. Hence, treatment of women with FSAD can be achieved by enhancement of genital blood flow with vasoactive agents. In our studies, we have clearly shown that cAMP mediates vaginal and clitoral vasorelaxation and that genital (e.g. vaginal and clitoral) blood flow can be enhanced/potentiated by elevation of cAMP levels. This is a seminal finding.

In this respect, no one has previously proposed that FSAD can be treated in such a way – i.e. by direct or indirect elevation of cAMP levels. Moreover, there are no teachings in the art to suggest that FSAD was associated with a detrimental modulation of cAMP activity and/or levels or that cAMP is responsible for mediating vaginal and clitoral vasorelaxation. Hence, the present invention is even further surprising.

2021

In addition, we have found that by using agents of the present invention it is possible to treat FSAD by increasing genital engorgement – e.g. increased lubrication in the vagina and increased sensitivity in the vagina and clitoris.

Thus, in a broad aspect, the present invention relates to the use of a cAMP potentiator to treat FSD, in particular FSAD.

The present invention is advantageous as it provides a means for restoring a normal sexual arousal response - namely increased genital blood flow leading to vaginal, clitoral and labial engorgement. This will result in increased vaginal lubrication *via* plasma transudation, increased vaginal compliance and increased genital (e.g. vaginal and clitoral) sensitivity. Hence, the present invention provides a means to restore, or potentiate, the normal sexual arousal response.

## DETAILED ASPECTS OF THE PRESENT INVENTION

In one aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient. Here, the composition (like any of the other compositions mentioned herein) may be packaged for subsequent use in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In another aspect, the present invention relates to the use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD.

In a further aspect, the present invention relates to a method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

In a further aspect, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can be used to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: determining whether an agent can directly or indirectly potentiate cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

By way of example, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with a moeity capable of affecting cAMP activity and/or levels; and measuring the activity and/or levels of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

By way of further example, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: contacting an agent with cAMP; and measuring the activity of cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In a further aspect, the present invention relates to a process comprising the steps of: (a) performing the assay according to the present invention; (b) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP activity; and (c) preparing a quantity of those one or more identified agents.

With this aspect, the agent identified in step (b) may be modified so as to, for example, maximise activity and then step (a) may be repeated. These steps may be repeated until the desired activity or pharmokinetic profile has been achieved.

Thus, in a further aspect, the present invention relates to a process comprising the steps of: (a1) performing the assay according to the present invention; (b1) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP activity, (b2) modifying one or more of said identified agents; (a2) optionally repeating step (a1); and (c) preparing a quantity of those one or more identified agents (i.e. those that have been modified).

2022

In a further aspect, the present invention relates to a method of treating FSD, in particular FSAD, by potentiating *in vivo* cAMP with an agent; wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP in an *in vitro* assay method; wherein the *in vitro* assay method is the assay method according to the present invention.

In a further aspect, the present invention relates to the use of an agent in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of FSD, in particular FSAD, wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP when assayed *in vitro* by the assay method according to the present invention.

In a further aspect, the present invention relates to an animal model used to identify agents capable of treating FSD (in particular FSAD), said model comprising an anaesthetised female animal including means to measure changes in vaginal and/or clitoral blood flow of said animal following stimulation of the pelvic nerve thereof.

In a further aspect, the present invention relates to an assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSAD, the assay method comprising: administering an agent to the animal model of the present invention; and measuring any potentiation of cAMP and/or increase in blood flow in the vagina and/or clitoris of said animal.

For ease of reference, these and further aspects of the present invention are now discussed under appropriate section headings. However, the teachings under each section are not necessarily limited to each particular section.

## PREFERABLE ASPECTS

Preferably, the agent is for the treatment of FSAD.

Preferably, the agent is a mediator of genital (e.g. vaginal or clitoral) vasorelaxation.

In one embodiment, preferably the agent is for oral administration.

In another embodiment, the agent may be for topical administration.

For some applications, preferably the agent has an indirect potentiating effect on cAMP. Examples of such agents include I:NEP and/or I:NPY. Alternatively expressed, for some applications, preferably the agent does not have a direct potentiating effect on cAMP. It is to be understood that the agent may have an indirect potentiating effect on cAMP by acting on naturally found and laturally located directly acting agents – such as naturally found and located VIP.

For some applications, preferably the agent has a direct potentiating effect on cAMP. Examples of such agents include I:PDE.

For some applications the agent of the present invention may be administered in conjunction with another pharmaceutically active agent. Here the co-administration need not be done at the same time, let alone by the same route. An example of a co-administration composition could be a composition that comprises an agent according to the present invention and an additional agent, wherein the additional agent could have a direct potentiating effect on cAMP. Combination examples are discussed *infra*.

For some applications, preferably the agent is an inhibitor – i.e. it is capable of exhibiting an inhibitory function.

For some applications, preferably the agent is an I:PDE (sometimes written as PDEi), more preferably an I:PDEII (sometimes written as I:PDE2 or PDEIIi or PDE2i).

For some applications, preferably the agent is a I:NEP (sometimes written as NEPi).

For some applications, preferably the agent is a I:NPY (sometimes written as NPYi).

For some applications, preferably the agent is a selective I:PDEII.

For some applications, preferably the agent is a selective I:NEP.

For some applications, preferably the agent is a selective I:NPY.

2023

For some applications, preferably the agent does not cause - or is administered in such a fashion so that it does not cause – a prolonged drop in blood pressure (e.g. over a period of about 5 minutes or more). In this embodiment, if the agent is to be delivered topically then that agent may have the ability to cause a drop in blood pressure (such as if it were to be delivered intraveneously), provided that in the topical application minimal levels of the agent pass into the blood stream. For an oral agent, it is preferred that the agent does not cause a prolonged drop in blood pressure.

In a preferred aspect, the agent does not cause - or is administered in such a fashion so that it does not cause – a large change in heart rate.

## TREATMENT

It is to be appreciated that all references herein to treatment include one or more of curative, palliative and prophylactic treatment. Preferably, the term treatment includes at least curative treatment and/or palliative tretament.

## FEMALE GENITALIA

The term "female genitalia" is used in accordance with the definition provided in Gray's Anatomy, C.D. Clemente, 13th American Edition – *viz*:

> *"The genital organs consist of an internal and external group. The internal organs are situated within the pelvis and consist of ovaries, the uterine tubes, uterus and the vagina. The external organs are superficial to the urogenital diaphragm and below the pelvic arch. They comprise the mons pubis, the labia majora and minora pudendi, the clitoris, the vestibule, the bulb of the vestibule, and the greater vestibular glands".*

## ENDOGENOUS cAMP

In a highly preferred embodiment the agent of the present invention potentiates endogenous cAMP – such as potentiates endogenous cAMP levels.

Here, the term "endogenous cAMP" means cAMP that arises from sexual stimulation (sexual arousal). Hence, the term does not encompass cAMP levels that will be elevated independent of sexual drive.

Thus, according to the present invention, treatment of FSAD is achieved by directly or indirectly potentiating endogenous cAMP signalling which, in turn, increases vaginal blood flow/lubrication and/or clitoral blood flow; thus enhancing the natural sexual arousal response. Thus, the treatment method of the present invention restores or potentiates the normal arousal response. In the treatment method of the present invention, this result may be achieved by use of an inhibitor of NEP (EC 3.4.24.11) or a cAMP-hydrolysing PDE inhibitor or a NPY receptor antagonist.

An animal test model is provided herein. This animal test model may be used to determine increases of genital blood flow as a result of cAMP potentiation. In this animal model a pelvic nerve is stimulated – which brings on an effect that mimics the physiology of a sexual arousal/response. In these experiments, agents according to the present invention cause an increase in blood flow after the nerve has been stimulated. In the absence of stimulation, the agents have no (or a negligible) effect in causing an increase in blood flow. Typically, in these experiments, the nerve is stimulated in order to obtain a base line increase in blood flow. Then a candidate (or actual) agent is delivered to the animal, such as by the oral route. An increase in blood flow is then indicative of an agent according to the present invention.

## SEXUAL STIMULATION

The present invention also encompasses administration of the agent of the present invention before and/or during sexual stimulation. Here the term "sexual stimulation" may be synonymous with the term "sexual arousal". This aspect of the present invention is advantageous because it provides systemic selectivity. The natural cascade only occurs at the genitalia and not in other locations – e.g. in the heart etc. Hence, it would be possible to achieve a selective effect on the genitalia.

Thus, for some aspects of the present invention it is highly desirable that there is a sexual stimulation step. We have found that this step can provide systemic selectivity. Here, "sexual stimulation" may be one or more of a visual stimulation, a physical stimulation, an auditory stimulation, or a thought stimulation.

Thus, preferably the agents of the present invention are delivered before or during sexual stimulation, particulaly when those agents are for oral delivery.

Hence, for this preferred aspect, the present invention provides for the use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; and wherein said female is sexually stimulated before or during administration of said medicament.

Preferably, the present invention provides for the use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein said female is sexually stimulated before or during administration of said medicament; and wherein said medicament is delivered orally to said female.

In addition, for this preferred aspect, the present invention provides for a method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said female is sexually stimulated before or during administration of said agent.

Preferably, the present invention provides for a method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; wherein said female is sexually stimulated before or during administration of said agent; and wherein said agent is delivered orally to said female.

## POTENTIATING cAMP

As used herein with reference to cAMP, the term "potentiating" includes any one or more of: increasing the effectiveness of cAMP, increasing the levels of cAMP, increasing the activity of cAMP, decreasing the level of cAMP degradation, decreasing the level of cAMP inhibition.

The potentiating effect can be a direct effect. An example of a direct effect would be upregulation of cAMP levels by an agent that increases the expression thereof.

Alternatively, the potentiating effect could be an indirect effect. An example of such an effect would be action on a substance that would otherwise inhibit and/or reduce the levels and/or activity of cAMP. Another example of such an effect would be increasing the action of a substance that increases the effectiveness of cAMP, increases the levels of cAMP, increases the activity of cAMP, decreases the level of cAMP degradation, or decreases the level of cAMP inhibition.

An example of a PcAMP would be I:PDE, such as I:PDEII.

## cAMP Mimetic

For some aspects of the present invention, the agent may act as a cAMP mimetic.

As used herein, the term "cAMP mimetic" means an agent that can act in a similar fashion (e.g. have a similar biological profile and effect) to cAMP in the female sexual genitalia and, in doing so, does any one or more of: increases the effectiveness of cAMP like moieties, increases the levels of cAMP like moieties, increases the activity of cAMP like moieties, decreases the level of degradation of cAMP like moieties, decreases the level of inhibition of cAMP like moieties.

Thus, in one aspect, the present invention relates to a pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

Thus, in another aspect, the present invention relates to the use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

Thus, in a further aspect, the present invention relates to a method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of acting as a cAMP mimetic in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to potentiate cAMP levels in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

An example of a cAMP mimetic would be forskolin. Here we have found that forskolin increases vaginal and clitoral blood flow and it can also act as a vaginal relaxant.

In a preferred aspect, the cAMP mimetic is administered orally.

## ACTIVATOR OF cAMP

As used herein, the term "activator of cAMP" means a substance that controls or releases cAMP in the female sexual genitalia. The control may be direct (e.g. on cAMP itself) or indirect (e.g. via activation of cAMP). For ease of reference, we refer to these substances as $A_{cAMP}$.

## TARGET

The term "target" as used herein with reference to the present invention means any substance that is cAMP, an $A_{cAMP}$, an $I_{cAMP}$, or an $AM_{cAMP}$. Otherwise expressed, the target can be referred to as a $P_{cAMP}$ target.

The target for the agent of the present invention may be an amino acid sequence and/or a nucleotide sequence encoding same and/or an expression unit responsible for the expression of same and/or a modulator of same.

The target may even be a combination of such targets.

## AGENT

The agent may be any suitable agent that can act as a $P_{cAMP}$.

The agent can be an amino acid sequence or a chemical derivative thereof. The substance may even be an organic compound or other chemical. The agent may even be a nucleotide sequence - which may be a sense sequence or an anti-sense sequence. The agent may even be an antibody.

Thus, the term "agent" includes, but is not limited to, a compound which may be obtainable from or produced by any suitable source, whether natural or not.

The agent may be designed or obtained from a library of compounds which may comprise peptides, as well as other compounds, such as small organic molecules, such as lead compounds.

By way of example, the agent may be a natural substance, a biological macromolecule, or an extract made from biological materials such as bacteria, fungi, or animal (particularly mammalian) cells or tissues, an organic or an inorganic molecule, a synthetic agent, a semi-synthetic agent, a structural or functional mimetic, a peptide, a peptidomimetics, a derivatised agent, a peptide cleaved from a whole protein, or a peptides synthesised synthetically (such as, by way of example, either using a peptide synthesizer or by recombinant techniques or combinations thereof, a recombinant agent, an antibody, a natural or a non-natural agent, a fusion protein or equivalent thereof and mutants, derivatives or combinations thereof.

As used herein, the term "agent" may be a single entity or it may be a combination of agents.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:NEP – that organic compound may typically comprise an amide group (i.e. –N(H)-C(O)- or even –C(O)-N(H)-) and one or more hydrocarbyl groups. Here, the term "hydrocarbyl group" means a group comprising at least C and H and may optionally comprise one or more other suitable substituents. Examples of such substituents may include halo-, alkoxy-, nitro-, an alkyl group, a cyclic group etc. In addition to the possibility of the substituents being a cyclic group, a combination of substituents may form a cyclic group. If the hydrocarbyl group comprises more than

7026

one C then those carbons need not necessarily be linked to each other. For example, at least two of the carbons may be linked *via* a suitable element or group. Thus, the hydrocarbyl group may contain hetero atoms. Suitable hetero atoms will be apparent to those skilled in the art and include, for instance, sulphur, nitrogen and oxygen. For some applications, preferably the agent comprises at least one cyclic group. For some applications, preferably the agent comprises at least one cyclic group linked to another hydrocarbyl group via an amide bond. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:PDE – that organic compound may typically comprise two or more linked hydrocarbyl groups. For some applications, preferably the agent comprises at least two cyclic groups – wherein one of which cyclic groups may be a fused cyclic ring structure. For some applications, preferably at least one of the cyclic groups is a heterocyclic group. For some applications, preferably the heterocyclic group comprises at least one N in the ring. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

If the agent is an organic compound then for some applications - such as if the agent is an I:NPY – that organic compound may typically comprise two or more linked hydrocarbyl groups. For some applications, preferably the agent comprises at least two cyclic groups – optionally wherein one of which cyclic groups may be a fused cyclic ring structure. For some applications, at least one of the cyclic groups is a heterocyclic group. For some applications, preferably the heterocyclic group comprises at least one N in the ring. Examples of such compounds are presented in the Examples section herein.

The agent may contain halo groups. Here, "halo" means fluoro, chloro, bromo or iodo.

The agent may contain one or more of alkyl, alkoxy, alkenyl, alkylene and alkenylene groups – which may be unbranched- or branched-chain.

The agent may be in the form of a pharmaceutically acceptable salt – such as an acid addition salt or a base salt – or a solvate thereof, including a hydrate thereof. For a review on suitable salts see Berge et al, J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19.

Suitable acid addition salts are formed from acids which form non-toxic salts and examples are the hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, sulphate, bisulphate, nitrate, phosphate, hydrogen phosphate, acetate, maleate, fumarate, lactate, tartrate, citrate, gluconate, succinate, saccharate, benzoate, methanesulphonate, ethanesulphonate, benzenesulphonate, p-toluenesulphonate and pamoate salts.

Suitable base salts are formed from bases which form non-toxic salts and examples are the sodium, potassium, aluminium, calcium, magnesium, zinc and diethanolamine salts.

A pharmaceutically acceptable salt of an agent of the present invention may be readily prepared by mixing together solutions of the agent and the desired acid or base, as appropriate. The salt may precipitate from solution and be collected by filtration or may be recovered by evaporation of the solvent.

The agent of the present invention may exisit in polymorphic form.

The agent of the present invention may contain one or more asymmetric carbon atoms and therefore exists in two or more stereoisomeric forms. Where an agent contains an alkenyl or alkenylene group, cis (E) and trans (Z) isomerism may also occur. The present invention includes the individual stereoisomers of the agent and, where appropriate, the individual tautomeric forms thereof, together with mixtures thereof.

Separation of diastereoisomers or cis and trans isomers may be achieved by conventional techniques, e.g. by fractional crystallisation, chromatography or H.P.L.C. of a stereoisomeric mixture of the agent or a suitable salt or derivative thereof. An individual enantiomer of the agent may also be prepared from a corresponding optically pure intermediate or by resolution, such as by H.P.L.C. of the corresponding racemate using a suitable chiral support or by fractional crystallisation of the diastereoisomeric salts formed by reaction of the corresponding racemate with a suitable optically active acid or base, as appropriate.

The present invention also includes all suitable isotopic variations of the agent or a pharmaceutically acceptable salt thereof. An isotopic variation of an agent of the present invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof is defined as one in which at least one atom is replaced by an atom having the same atomic number but an atomic mass different from the atomic mass usually found in nature. Examples of isotopes that can be incorporated into the agent and pharmaceutically acceptable salts thereof include isotopes of hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, phosphorus, sulphur, fluorine and chlorine such as $^{2}H$, $^{3}H$, $^{13}C$, $^{14}C$, $^{15}N$, $^{17}O$, $^{18}O$, $^{31}P$, $^{32}P$, $^{35}S$, $^{18}F$ and $^{36}Cl$, respectively. Certain isotopic variations of the agent and pharmaceutically acceptable salts thereof, for example, those in which a radioactive isotope such as $^{3}H$ or $^{14}C$ is incorporated, are useful in drug and/or substrate tissue distribution studies. Tritiated, i.e., $^{3}H$, and carbon-14, i.e., $^{14}C$, isotopes are particularly preferred for their ease of preparation and detectability. Further, substitution with isotopes such as deuterium, i.e., $^{2}H$, may afford certain therapeutic advantages resulting from greater metabolic stability, for example, increased *in vivo* half-life or reduced dosage requirements and hence may be preferred in some circumstances. Isotopic variations of the agent of the present invention and pharmaceutically acceptable salts thereof of this invention can generally be prepared by conventional procedures using appropriate isotopic variations of suitable reagents.

It will be appreciated by those skilled in the art that the agent of the present invention may be derived from a prodrug. Examples of prodrugs include entities that have certain protected group(s) and which may not possess pharmacological activity as such, but may, in certain instances, be administered (such as orally or parenterally) and thereafter metabolised in the body to form the agent of the present invention which are pharmacologically active.

It will be further appreciated that certain moieties known as "pro-moieties", for example as described in "Design of Prodrugs" by H. Bundgaard, Elsevier, 1985 (the disclosured of which is hereby incorporated by reference), may be placed on appropriate functionalities of the agents. Such prodrugs are also included within the scope of the invention.

The $P_{cAMP}$ may do any one or more of: directly or indirectly increase the effectiveness of cAMP, directly or indirectly increase the levels of cAMP, directly or indirectly increase the activity of cAMP, directly or indirectly decrease the level of cAMP degradation, directly or indirectly decrease the level of cAMP inhibition.

Preferably, the agent directly or indirectly increases cAMP levels in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

More preferably, the agent directly or indirectly selectively increases cAMP levels in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD.

More preferably, the agent directly or indirectly selectively increases cAMP levels wherein said cAMP is sexually arousal induced cAMP.

In a highly preferred aspect, the agent of the present invention increases the relative amount of sexual arousal induced cAMP.

For some applications, the agent selectively treats FSAD.

In one aspect, the agent may inhibit or antagonise a suitable target and in doing so potentiate cAMP levels in the female sexual genitalia. In the text, we have used the term inhibitor to mean an inhibitor and/or antagonist.

In another aspect, the agent may activate or agonise a suitable target and in doing so potentiate cAMP levels in the female sexual genitalia. In the text, we have used the terms activator and upregulator inhibitor to mean activator and/or upregulator and/or agonist.

Thus, the agent may agonise, antagonise, upregulate, or inhibit a suitable target.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

Preferably, the agent may selectively agonise, selectively antagonise, selectively upregulate, or selectively inhibit a suitable target.

2078

Preferably, the agent may selectively agonise, selectively antagonise, selectively upregulate, or selectively inhibit a selective, suitable target.

The agent of the present invention may also be capable of displaying one or more other beneficial functional properties. By way of example, the agent of the present invention may potentiate cAMP as well as potentiating cGMP.

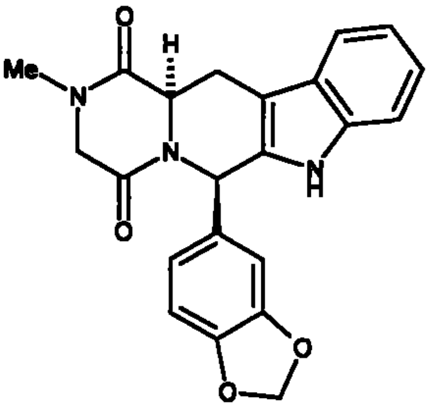
For some applications (such as a topical application), the agent may also display an ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitory action. An ACE assay is presented in the Experimental Section herein. For some applications (such as with particular patient types), such agents (i.e. those that also display ACE inhibitory action) may not be suitable for oral administration.

For some applications, the agent may also display an ECE (endothelium converting enzyme) inhibitory action. ECE assays are well known in the art.

## PHARMACEUTICAL COMBINATIONS

The agent may be used in combination with one or more other pharmaceutically active agents, such as a PcGMP (such a phosphodiestertase type 5 inhibitor eg Sildenafil, or a nitric oxide donor, or a nitric oxide precursor eg L-argininse) and/or a centrally acting pharmaceutical (e.g. a dopamine receptor or melanocortin receptor agonist, such as apomorphine or melanotan II). Teachings on the use of apomorphine as a pharmaceutical may be found in US-A-5945117. In that particular document, apomorphine is delivered sub-lingually. In addition, or in the alternative, the agent may be used in combination with one or more of: a PDE5 inhibitor (eg sildenafil, vardenafil (Bayer BA 38-9456) and IC351 (Cialis, Icos Lilly)), one or more of a nitric oxide donor (eg NMI-921), one or more of a dopamine receptor agonist (eg apomorphine, Uprima, Ixsene), one or more of a melanocortin receptor agonist (eg Melanotan II or PT14), one or more of a potassium channel opener (eg a $K_{ATP}$ channel opener (eg minoxidil, nicorandil) and/or a calcium activated potassium channel opener (eg BMS-204352), one or more of a a1-adrenoceptor antagonist (eg phentolamine, Vasofem, Vasomax), one or more of a VIP receptor agonist or a VIP analogue (eg Ro-125-1553) or a VIP fragment, one or more of a α-adrenoceptor antagonist with VIP combination (eg Invicorp, Aviptadil), one or more of a α2-adrenoceptor antagonist (eg yohimbine), one or more of a estrogen, estrogen and medroxyprogesterone or medroxyprogesterone acetate (MPA) or oestrogen and methyl testosterone hormone replacement therapy agent (eg HRT especially Premarin, Cenestin, Oestrofeminal, Equin, Estrace, Estrofem, Elleste Solo, Estring, Eastraderm, Eastraderm TTS, Eastraderm Matrix, Dermestril, Premphase, Prempro, Prempak, Premique, Estratest, Estratest HS, Tibolone), one or more of a testosterone replacement agent (inc DHEA (dehydroandrostendione), testosterone (Tostrelle) or a testosterone implant (Organon)), one or more of a testosterone/oestradiol agent one or more of an estrogen agonists, one or more of a serotonin receptor agonist or antagonist (eg 5HT1A, 5HT2C, 5HT2A and 5HT3 receptor agonists and antagonists; as described in WO2000/28993), one or more of a prostanoid receptor agonist (eg Muse, alprostadil, misoprostol), one or more of a purinergic receptor agonist (especially P2Y2 and P2Y4) one or more antidepressant agents (eg bupropion (Wellbutrin), mirrtazapine, nefazodone).

The structure of IC351 is:



IC351 (Icos Lilly)

If a combination of active agents are administered, then they may be administered simultaneously, separately or sequentially.

VIP COMBINATION

According to the present invention, the agent is not VIP (or preferably not an analogue thereof or a fragment thereof). However, for some embodiments, the agent of the present invention may be co-administered with VIP or an analogue thereof or a fragment thereof.

In a highly preferred aspect, VIP or an analogue thereof or a fragment thereof is not administered. This is because there has been a report that VIP infusions lead to significant cardiovascular adverse effects such as increases in heart rate and a decrease in diastolic arterial blood pressure (Ottesen 1983, 1987, 1995)

In addition, and even though, Ottesen and co-workers have demonstrated that VIP induces increases in vaginal blood flow and lubrication in healthy volunteers, the mechanism by which VIP is exerting it's effects are unclear. In the literature, there are a number of examples of VIP signalling through different second messenger systems eg cGMP/guanylate cyclase (Ashur-Fabian, 1999); carbon monoxide (CO)/heme oxygenase (Fan et al.,1998) and cAMP/adenylate cyclase (Foda,1995; Schoeffter, 1985; Gu, 1992). This is exemplified by a recent report which describes how the vasorelaxant effects of VIP in the uterine artery can be explained by the release of nitric oxide. (Jovanovic, 1998). Again, there is also evidence for VIP modulating nitric oxide (NO)/cGMP in male urogenital function (Kim, 1994).

Furthermore, in the literature it has been reported that VIP has no effect on cAMP levels in vaginal smooth muscle cell cultures (see Traish, A., Moreland, R.B., Huang, Y., *et al.* (1999). Development of human and rabbit vaginal smooth muscle cell cultures: Effects of vasoactive agents on intracellular levels of cyclic nucleotides. *Mol. Cell Biol. Res. Comm.*, 2, 131-137).

Moreover, in follow up studies, Ottesen and co-workers (see Palle, Bredkjaer, Ottesen and Fahrenkrug 1990 Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology vol 17 61-68), report that the effect of VIP on vaginal blood flow irrespective of the route of administration is part of a systemic vasodilatory effect rather than a local response. In addition, they report on a number of vascular side effects associated with VIP – *viz* flushing, hypotension and tachycardia.

## $K_i$ VALUES

For some applications, preferably the agent of the present invention has a $K_i$ value of less than about 100 nM, preferably less than about 75 nM, preferably less than about 50 nM, preferably less than about 25 nM, preferably less than about 20 nM, preferably less than about 15 nM, preferably less than about 10 nM, preferably less than about 5 nM.

## $K_b$ VALUES

For some applications, preferably the agent of the present invention has a $K_b$ value of less than about 100 nM, preferably less than about 75 nM, preferably less than about 50 nM, preferably less than about 25 nM, preferably less than about 20 nM, preferably less than about 15 nM, preferably less than about 10 nM, preferably less than about 5 nM.

## $K_a$ VALUES

For some applications, preferably the agent of the present invention has a $K_a$ value of less than about 100 nM, preferably less than about 75 nM, preferably less than about 50 nM, preferably less than about 25 nM, preferably less than about 20 nM, preferably less than about 15 nM, preferably less than about 10 nM, preferably less than about 5 nM.

## PHARMOKINETICS

For some embodiments of the present invention, preferably the agents of the present invention (e.g. I:NEP inhibitors) have a log D of -2 to +4, more preferably -1 to +2. The log D can be determined by standard procedures known in the art such as described in J. Pharm. Pharmacol. 1990, 42:144.

In addition, or in the alternative, for some embodiments preferably the agents of the present invention (e.g. I:NEP) have a caco-2 flux of greater than $2x10^{-6}cms^{-1}$, more preferably greater than $5x10^{-6}cms^{-1}$. The caco flux value can be determined by standard procedures known in the art such as described in J. Pharm. Sci 79, 7, p595-600 (1990), and Pharm. Res. vol 14, no. 6 (1997).

## SELECTIVITY

For some applications, preferably the agent of the present invention has at least about a 100 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 150 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 200 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 250 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 300 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 350 fold selectivity to the desired target.

2030

For some applications, preferably the agent of the present invention has at least about a 400 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 500 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 600 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 700 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 800 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 900 fold selectivity to the desired target, preferably at least about a 1000 fold selectivity to the desired target.

## CHEMICAL SYNTHESIS METHODS

Typically the agent of the present invention will be prepared by chemical synthesis techniques.

The agent or target of the present invention or variants, homologues, derivatives, fragments or mimetics thereof may be produced using chemical methods to synthesize the agent in whole or in part. For example, peptides can be synthesized by solid phase techniques, cleaved from the resin, and purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g., Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY). The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or sequencing (e.g., the Edman.degradation procedure; Creighton, *supra*).

Direct synthesis of the agent or variants, homologues, derivatives, fragments or mimetics thereof can be performed using various solid-phase techniques (Roberge JY *et al* (1995) Science 269: 202-204) and automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 43 1 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) in accordance with the instructions provided by the manufacturer. Additionally, the amino acid sequences comprising the agent or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with a sequence from other subunits, or any part thereof, to produce a variant agent, such as, for example, a variant PDE, NEP or NPY.

In an alternative embodiment of the invention, the coding sequence of the agent or variants, homologues, derivatives, fragments or mimetics thereof may be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see

Caruthers MH *et al* (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23, Horn T *et al* (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

## MIMETIC

As used herein, the term "mimetic" relates to any chemical which includes, but is not limited to, a peptide, polypeptide, antibody or other organic chemical which has the same qualitative activity or effect as a reference agent to target.

## CHEMICAL DERIVATIVE

The term "derivative" or "derivatised" as used herein includes chemical modification of an agent. Illustrative of such chemical modifications would be replacement of hydrogen by a halo group, an alkyl group, an acyl group or an amino group.

## CHEMICAL MODIFICATION

In one embodiment of the present invention, the agent may be a chemically modified agent.

The chemical modification of an agent of the present invention may either enhance or reduce hydrogen bonding interaction, charge interaction, hydrophobic interaction, Van Der Waals interaction or dipole interaction between the agent and the target.

In one aspect, the identified agent may act as a model (for example, a template) for the development of other compounds.

## RECOMBINANT METHODS

Typically the target of the present invention for use in the assay of the present invention may be prepared by recombinant DNA techniques.

## POTENTIATING cGMP

As used herein with reference to cGMP, the term "potentiating" includes any one or more of: increasing the effectiveness of cGMP, increasing the levels of cGMP, increasing the activity of cGMP, decreasing the level of cGMP degradation, decreasing the level of cGMP inhibition.

The potentiating effect can be a direct effect. Alternatively, it could be a secondary effect and/or a downstream effect.

Here, preferably, the agent that potentiates cGMP acts on a $I_{cGMP}$ and/or an $AM_{cGMP}$ wherein the modulator of cGMP has an adverse effect on cGMP, such that the agent reduces and/or eliminates and/or masks and/or diverts the detrimental effect of the $I_{cGMP}$ and/or the $AM_{cGMP}$ towards cGMP.

Hence, the present invention encompasses a combination of one or more $I{:}I_{cAMP}$ and one or more $I{:}I_{cGMP}$.

In one aspect, the $I{:}I_{cGMP}$ is a $I{:}PDE_{cGMP}$.

## $I_{cAMP}$ AND/OR $AM_{cAMP}$

We have shown that cAMP mediates genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow and by enhancing cAMP signalling we can enhance genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow in an animal model. Thus, an agent that upregulates/enhances cAMP-mediated vasorelaxation will be efficacious in the treatment of FSAD. For ease of reference, we refer to these substances as $I_{cAMP}$ and/or an $AM_{cAMP}$. Here, the $I_{cAMP}$ and the $AM_{cAMP}$ have an adverse effect on cAMP levels or activity.

Thus, the agent may be any one of more of: an $I{:}I_{cAMP}$ and/or an $I{:}AM_{cAMP}$.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

Examples of $I_{cAMP}$ and the $AM_{cAMP}$ include one or more of PDE(s), NPY and NEP, or any component associated therewith. The associated component may be, for example, a receptor and/or a co-factor.

Thus, preferably the agent may be any one of more of: an I:$PDE_{cAMP}$, an I:NPY (sometimes written as NPYi), an I:NPY $Y_n$ (sometimes written as NPY $Y_n$I), and I:NEP.

Likewise, the agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

## I:$I_{cAMP}$ AND/OR I:$AM_{cAMP}$

In accordance with the present invention we have found that it is possible to treat and/or prevent FSAD by using an agent that reduces and/or eliminates and/or masks and/or diverts and/or prevents the detrimental effect of the $I_{cAMP}$ and/or the $AM_{cAMP}$ towards cAMP. The agent may even restore cAMP levels that were decreased by the a $I_{cAMP}$ and/or a $AM_{cAMP}$. For ease, we refer to these substances as I:$I_{cAMP}$ and/or a I:$AM_{cAMP}$. Here, the I:$I_{cAMP}$ and the I:$AM_{cAMP}$ prevent or reduce the adverse effect on cAMP levels or activity.

Thus, in one preferred aspect, the agent is an I:$I_{cAMP}$ and/or an I:$AM_{cAMP}$ wherein the $AM_{cAMP}$ has a detrimental effect on $AM_{cAMP}$.

In a preferred aspect, the agent may be one or more of:

I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$ (where n denotes an appropriate class or sub-class)
I:NPY
I:NPY $Y_n$ (where n denotes an appropriate class or sub-class)I:NEP

## $A_{cAMP}$

In accordance with the present invention, we have found that one of the important causes of FSAD is due to low levels or low activity of cAMP in the female genitalia.

2032

Thus, the agent may be a U:$A_{cAMP}$.

Examples of $A_{cAMP}$ include VIP and AC, or any component associated therewith. The associated component may be, for example, a receptor and/or a co-factor.

Thus, preferably the agent may be any one of more of: A:AC, A:VIPr, A:$VIP_n$, I:I:VIPr or I:I:$VIP_n$.

The agent may be a single entity that is capable of exhibiting two or more of these properties. Alternatively, or in addition, the agent can be a combination of agents that are capable of exhibiting one or more of these properties.

U:$A_{cAMP}$

In another respect, preferably, the target is a component that increases the level of cAMP. Hence, the agent can be an U:AC

By way of example, the target could be cAMP itself or AC or VIP (or combinations thereof).

Hence, by way of example, the agent can be any one of : an U:$A_{cAMP}$, an A:AC, an A:VIPr, an A:$VIP_n$, an I:I:VIPr or an I:I:$VIP_n$.

COMBINATION OF I:$I_{cAMP}$ AND/OR I:$M_{cAMP}$ AND/OR U:$A_{cAMP}$

In another aspect, the agent of the present invention may even be a combination of cAMP potentiators. By way of example, the agent of the present invention may be two or more of:

I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr

A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$.

COMBINATION OF cAMP Mimetic and I:I$_{cAMP}$ AND/OR I:M$_{cAMP}$ AND/OR U:A$_{cAMP}$

In another aspect, the agent of the present invention may even be a combination of a cAMP mimetic and one or more cAMP potentiators. By way of example, the agent of the present invention may be a cAMP mimetic and one or more of:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$.

INHIBITOR

The term "inhibitor" as used herein with respect to the agent of the present invention means an agent that can reduce and/or eliminate and/or mask and/or prevent the detrimental action of a I$_{cAMP}$ and/or a detrimental M$_{cAMP}$ towards cAMP. The inhibitor may act as an antagonist.

ACTIVATOR

The term "activator" as used herein with respect to the agent of the present invention means an agent that can increase and/or produce and/or unmask and/or elevate and/or ensure action of cAMP and/or an A$_{cAMP}$. The activator may act as an agonist.

## OTHER ACTIVE COMPONENTS

In another aspect, the agent of the present invention may even be in combination with one or more other active components - such as one or more agents capable of potentiating cGMP.

## AMINO ACID SEQUENCE

As used herein, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "polypeptide" and/or the term "protein". In some instances, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "peptide". In some instances, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "protein".

The amino acid sequence may be prepared isolated from a suitable source, or it may be made synthetically or it may be prepared by use of recombinant DNA techniques.

In one aspect, the present invention provides an amino acid sequence that is capable of acting as a target in an assay for the identification of one or more agents and/or derivatives thereof capable of affecting the amino acid sequence in order to potentiate cAMP to treat FSAD.

## NUCLEOTIDE SEQUENCE

As used herein, the term "nucleotide sequence" is synonymous with the term "polynucleotide".

The nucleotide sequence may be DNA or RNA of genomic or synthetic or of recombinant origin. The nucleotide sequence may be double-stranded or single-stranded whether representing the sense or antisense strand or combinations thereof.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is DNA.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is prepared by use of recombinant DNA techniques (e.g. recombinant DNA).

For some applications, preferably, the nucleotide sequence is cDNA.

For some applications, preferably, the nucleotide sequence may be the same as the naturally occurring form for this aspect.

In one aspect, the present invention provides a nucleotide sequence encoding a substance capable of acting as a target in an assay (such as a yeast two hybrid assay) for the identification of one or more agents and/or derivatives thereof capable of affecting the substance in order to potentiate cAMP to treat FSAD.

It will be understood by a skilled person that numerous different nucleotide sequences can encode the targets of the present invention as a result of the degeneracy of the genetic code. In addition, it is to be understood that skilled persons may, using routine techniques, make nucleotide substitutions that do not substantially affect the activity encoded by the nucleotide sequence of the present invention to reflect the codon usage of any particular host organism in which the target of the present invention is to be expressed. Thus, the terms "variant", "homologue" or "derivative" in relation to the nucleotide sequence set out in the attached sequence listings include any substitution of, variation of, modification of, replacement of, deletion of or addition of one (or more) nucleic acid from or to the sequence providing the resultant nucleotide sequence encodes a functional target according the present invention (or even an agent according to the present invention if said agent comprises a nucleotide sequence or an amino acid sequence).

As indicated above, with respect to sequence homology, preferably there is at least 75%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90% homology to the sequences shown in the sequence listing herein. More preferably there is at least 95%, more preferably at least 98%, homology. Nucleotide homology comparisons may be conducted as described above. A preferred sequence comparison program is the GCG Wisconsin Bestfit program described above. The default scoring matrix has a match value of 10 for each identical nucleotide and -9 for each mismatch. The default gap creation penalty is -50 and the default gap extension penalty is -3 for each nucleotide.

The present invention also encompasses nucleotide sequences that are capable of hybridising selectively to the sequences presented herein, or any variant, fragment or derivative thereof, or to the complement of any of the above. Nucleotide sequences are preferably at least 15 nucleotides in length, more preferably at least 20, 30, 40 or 50

2034

nucleotides in length. These sequences could be used a probes, such as in a diagnostic kit.

## VARIANTS/HOMOLOGUES/DERIVATIVES

In addition to the specific amino acid sequences and nucleotide sequences mentioned herein, the present invention also encompasses the use of variants, homologue and derivatives thereof. Here, the term "homology" can be equated with "identity".

In the present context, an homologous sequence is taken to include an amino acid sequence which may be at least 75, 85 or 90% identical, preferably at least 95 or 98% identical. In particular, homology should typically be considered with respect to those regions of the sequence known to be essential for an activity. Although homology can also be considered in terms of similarity (i.e. amino acid residues having similar chemical properties/functions), in the context of the present invention it is preferred to express homology in terms of sequence identity.

Homology comparisons can be conducted by eye, or more usually, with the aid of readily available sequence comparison programs. These commercially available computer programs can calculate % homology between two or more sequences.

% homology may be calculated over contiguous sequences, i.e. one sequence is aligned with the other sequence and each amino acid in one sequence is directly compared with the corresponding amino acid in the other sequence, one residue at a time. This is called an "ungapped" alignment. Typically, such ungapped alignments are performed only over a relatively short number of residues.

Although this is a very simple and consistent method, it fails to take into consideration that, for example, in an otherwise identical pair of sequences, one insertion or deletion will cause the following amino acid residues to be put out of alignment, thus potentially resulting in a large reduction in % homology when a global alignment is performed. Consequently, most sequence comparison methods are designed to produce optimal alignments that take into consideration possible insertions and deletions without penalising unduly the overall homology score. This is achieved by inserting "gaps" in the sequence alignment to try to maximise local homology.

However, these more complex methods assign "gap penalties" to each gap that occurs in the alignment so that, for the same number of identical amino acids, a sequence alignment with as few gaps as possible - reflecting higher relatedness between the two compared sequences - will achieve a higher score than one with many gaps. "Affine gap costs" are typically used that charge a relatively high cost for the existence of a gap and a smaller penalty for each subsequent residue in the gap. This is the most commonly used gap scoring system. High gap penalties will of course produce optimised alignments with fewer gaps. Most alignment programs allow the gap penalties to be modified. However, it is preferred to use the default values when using such software for sequence comparisons. For example when using the GCG Wisconsin Bestfit package (see below) the default gap penalty for amino acid sequences is -12 for a gap and -4 for each extension.

Calculation of maximum % homology therefore firstly requires the production of an optimal alignment, taking into consideration gap penalties. A suitable computer program for carrying out such an alignment is the GCG Wisconsin Bestfit package (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux *et al.*, 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Examples of other software than can perform sequence comparisons include, but are not limited to, the BLAST package (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* – Chapter 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol., 403-410) and the GENEWORKS suite of comparison tools. Both BLAST and FASTA are available for offline and online searching (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, pages 7-58 to 7-60). However it is preferred to use the GCG Bestfit program. A new tool, called BLAST 2 Sequences is also available for comparing protein and nucleotide sequence (see FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 and tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Although the final % homology can be measured in terms of identity, the alignment process itself is typically not based on an all-or-nothing pair comparison. Instead, a scaled similarity score matrix is generally used that assigns scores to each pairwise comparison based on chemical similarity or evolutionary distance. An example of such a matrix commonly used is the BLOSUM62 matrix - the default matrix for the BLAST suite of programs. GCG Wisconsin programs generally use either the public default values or a custom symbol comparison table if supplied (see user manual for further details). It is preferred to use the public default values for the GCG package, or in the case of other software, the default matrix, such as BLOSUM62.

Once the software has produced an optimal alignment, it is possible to calculate % homology, preferably % sequence identity. The software typically does this as part of the sequence comparison and generates a numerical result.

The sequences may also have deletions, insertions or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent substance. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues as long as the secondary binding activity of the substance is retained. For example, negatively charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids include lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine, valine, glycine, alanine, asparagine, glutamine, serine, threonine, phenylalanine, and tyrosine.

Conservative substitutions may be made, for example according to the Table below. Amino acids in the same block in the second column and preferably in the same line in the third column may be substituted for each other:

| | | |
|---|---|---|
| ALIPHATIC | Non-polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar - uncharged | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar - charged | D E |
| | | K R |
| AROMATIC | | H F W Y |

The present invention also encompasses homologous substitution (substitution and replacement are both used herein to mean the interchange of an existing amino acid residue, with an alternative residue) may occur i.e. like-for-like substitution such as basic for basic, acidic for acidic, polar for polar etc. Non-homologous substitution may also occur i.e. from one class of residue to another or alternatively involving the inclusion of unnatural amino acids such as ornithine (hereinafter referred to as Z), diaminobutyric acid ornithine (hereinafter referred to as B), norleucine ornithine (hereinafter referred to as O), pyriylalanine, thienylalanine, naphthylalanine and phenylglycine.

Replacements may also be made by unnatural amino acids include; alpha* and alpha-disubstituted* amino acids, N-alkyl amino acids*, lactic acid*, halide derivatives of natural amino acids such as trifluorotyrosine*, p-Cl-phenylalanine*, p-Br-phenylalanine*, p-I-phenylalanine*, L-allyl-glycine*, ß-alanine*, L-α-amino butyric acid*, L-γ-amino butyric acid*, L-α-amino isobutyric acid*, L-ε-amino caproic acid#, 7-amino heptanoic acid*, L-methionine sulfone#*, L-norleucine*, L-norvaline*, p-nitro-L-phenylalanine*, L-hydroxyproline#, L-thioproline*, methyl derivatives of phenylalanine (Phe) such as 4-methyl-Phe*, pentamethyl-Phe*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (methyl)*, L-Phe (4-isopropyl)*, L-Tic (1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxyl acid)*, L-diaminopropionic acid # and L-Phe (4-benzyl)*. The notation * has been utilised for the purpose of the discussion above (relating to homologous or non-homologous substitution), to indicate the hydrophobic nature of the derivative whereas # has been utilised to indicate the hydrophilic nature of the derivative, #* indicates amphipathic characteristics.

Variant amino acid sequences may include suitable spacer groups that may be inserted between any two amino acid residues of the sequence including alkyl groups such as methyl, ethyl or propyl groups in addition to amino acid spacers such as glycine or β-alanine residues. A further form of variation, involves the presence of one or more amino acid residues in peptoid form, will be well understood by those skilled in the art. For the avoidance of doubt, "the peptoid form" is used to refer to variant amino acid residues wherein the α-carbon substituent group is on the residue's nitrogen atom rather than the α-carbon. Processes for preparing peptides in the peptoid form are known in the art, for example Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 and Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

## HYBRIDISATION

The present invention also encompasses the use of sequences that can hybridise to the target sequences presented herein – such as if the agent is an anti-sense sequence.

The term "hybridization" as used herein shall include "the process by which a strand of nucleic acid joins with a complementary strand through base pairing" as well as the process of amplification as carried out in polymerase chain reaction (PCR) technologies.

Nucleotide sequences of the invention capable of selectively hybridising to the nucleotide sequences presented herein, or to their complement, will be generally at least 75%, preferably at least 85 or 90% and more preferably at least 95% or 98% homologous to the corresponding complementary nucleotide sequences presented herein over a region of at least 20, preferably at least 25 or 30, for instance at least 40, 60 or 100 or more contiguous nucleotides. Preferred nucleotide sequences of the invention will comprise regions homologous to the nucleotide sequence set out in SEQ ID No 2 of the sequence listings of the present invention preferably at least 80 or 90% and more preferably at least 95% homologous to the nucleotide sequence set out in SEQ ID No 2 of the sequence listings of the present invention.

The term "selectively hybridizable" means that the nucleotide sequence, when used as a probe, is used under conditions where a target nucleotide sequence of the invention is found to hybridize to the probe at a level significantly above background. The background hybridization may occur because of other nucleotide sequences present, for example, in the cDNA or genomic DNA library being screened. In this event, background implies a level of signal generated by interaction between the probe and a non-specific DNA member of the library which is less than 10 fold, preferably less than 100 fold as intense as the specific interaction observed with the target DNA. The intensity of interaction may be measured, for example, by radiolabelling the probe, e.g. with $^{32}$P.

Hybridization conditions are based on the melting temperature (Tm) of the nucleic acid binding complex, as taught in Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego CA), and confer a defined "stringency" as explained below.

Maximum stringency typically occurs at about Tm-5°C (5°C below the Tm of the probe); high stringency at about 5°C to 10°C below Tm; intermediate stringency at about 10°C to 20°C below Tm; and low stringency at about 20°C to 25°C below Tm.

As will be understood by those of skill in the art, a maximum stringency hybridization can be used to identify or detect identical nucleotide sequences while an intermediate (or low) stringency hybridization can be used to identify or detect similar or related polynucleotide sequences.

In a preferred aspect, the present invention covers nucleotide sequences that can hybridise to the nucleotide sequence of the present invention under stringent conditions (e.g. 65°C and 0.1xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M $Na_3$ Citrate pH 7.0). Where the nucleotide sequence of the invention is double-stranded, both strands of the duplex, either individually or in combination, are encompassed by the present invention. Where the nucleotide sequence is single-stranded, it is to be understood that the complementary sequence of that nucleotide sequence is also included within the scope of the present invention.

Nucleotide sequences which are not 100% homologous to the sequences of the present invention but fall within the scope of the invention can be obtained in a number of ways. Other variants of the sequences described herein may be obtained for example by probing DNA libraries made from a range of sources. In addition, other viral/bacterial, or cellular homologues particularly cellular homologues found in mammalian cells (e.g. rat, mouse, bovine and primate cells), may be obtained and such homologues and fragments thereof in general will be capable of selectively hybridising to the sequences shown in the sequence listing herein. Such sequences may be obtained by probing cDNA libraries made from or genomic DNA libraries from other animal species, and probing such libraries with probes comprising all or part of the nucleotide sequence set out in herein under conditions of medium to high stringency. Similar considerations apply to obtaining species homologues and allelic variants of the amino acid and/or nucleotide sequences of the present invention.

Variants and strain/species homologues may also be obtained using degenerate PCR which will use primers designed to target sequences within the variants and homologues encoding conserved amino acid sequences within the sequences of the present invention. Conserved sequences can be predicted, for example, by aligning the amino acid sequences from several variants/homologues. Sequence alignments can be performed using computer software known in the art. For example the GCG Wisconsin PileUp program is widely used. The primers used in degenerate PCR will contain one or more degenerate positions and will be used at stringency conditions

1037

lower than those used for cloning sequences with single sequence primers against known sequences.

Alternatively, such nucleotide sequences may be obtained by site directed mutagenesis of characterised sequences, such as the nucleotide sequence set out in SEQ ID No 2 of the sequence listings of the present invention. This may be useful where for example silent codon changes are required to sequences to optimise codon preferences for a particular host cell in which the nucleotide sequences are being expressed. Other sequence changes may be desired in order to introduce restriction enzyme recognition sites, or to alter the activity of the protein encoded by the nucleotide sequences.

The nucleotide sequences of the present invention may be used to produce a primer, e.g. a PCR primer, a primer for an alternative amplification reaction, a probe e.g. labelled with a revealing label by conventional means using radioactive or non-radioactive labels, or the nucleotide sequences may be cloned into vectors. Such primers, probes and other fragments will be at least 15, preferably at least 20, for example at least 25, 30 or 40 nucleotides in length, and are also encompassed by the term nucleotide sequence of the invention as used herein.

The nucleotide sequences such as a DNA polynucleotides and probes according to the invention may be produced recombinantly, synthetically, or by any means available to those of skill in the art. They may also be cloned by standard techniques.

In general, primers will be produced by synthetic means, involving a step wise manufacture of the desired nucleic acid sequence one nucleotide at a time. Techniques for accomplishing this using automated techniques are readily available in the art.

Longer nucleotide sequences will generally be produced using recombinant means, for example using a PCR (polymerase chain reaction) cloning techniques. This will involve making a pair of primers (e.g. of about 15 to 30 nucleotides) flanking a region of the targeting sequence which it is desired to clone, bringing the primers into contact with mRNA or cDNA obtained from an animal or human cell, performing a polymerase chain reaction (PCR) under conditions which bring about amplification of the desired region, isolating the amplified fragment (e.g. by purifying the reaction mixture on an agarose gel) and recovering the amplified DNA. The primers may be designed to contain suitable restriction enzyme recognition sites so that the amplified DNA can be cloned into a suitable cloning vector.

Due to the inherent degeneracy of the genetic code, other DNA sequences which encode substantially the same or a functionally equivalent amino acid sequence, may be used to clone and express the target sequences. As will be understood by those of skill in the art, for certain expression systems, it may be advantageous to produce the target sequences with non-naturally occurring codons. Codons preferred by a particular prokaryotic or eukaryotic host (Murray E *et al* (1989) Nuc Acids Res 17:477-508) can be selected, for example, to increase the rate of the target expression or to produce recombinant RNA transcripts having desirable properties, such as a longer half-life, than transcripts produced from naturally occurring sequence.

## EXPRESSION VECTORS

The nucleotide sequence for use as the target or for expressing the target can be incorporated into a recombinant replicable vector. The vector may be used to replicate and express the nucleotide sequence in and/or from a compatible host cell. Expression may be controlled using control sequences which include promoters/enhancers and other expression regulation signals. Prokaryotic promoters and promoters functional in eukaryotic cells may be used. Tissue specific or stimuli specific promoters may be used. Chimeric promoters may also be used comprising sequence elements from two or more different promoters described above.

The protein produced by a host recombinant cell by expression of the nucleotide sequence may be secreted or may be contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. The coding sequences can be designed with signal sequences which direct secretion of the substance coding sequences through a particular prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

## FUSION PROTEINS

The target amino acid sequence may be produced as a fusion protein, for example to aid in extraction and purification. Examples of fusion protein partners include glutathione-S-transferase (GST), 6xHis, GAL4 (DNA binding and/or transcriptional activation domains) and β-galactosidase. It may also be convenient to include a proteolytic cleavage site between the fusion protein partner and the protein sequence

of interest to allow removal of fusion protein sequences. Preferably the fusion protein will not hinder the activity of the target.

The fusion protein may comprise an antigen or an antigenic determinant fused to the substance of the present invention. In this embodiment, the fusion protein may be a non-naturally occurring fusion protein comprising a substance which may act as an adjuvant in the sense of providing a generalised stimulation of the immune system. The antigen or antigenic determinant may be attached to either the amino or carboxy terminus of the substance.

In another embodiment of the invention, the amino acid sequence may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, for screening of peptide libraries for agents capable of affecting the substance activity, it may be useful to encode a chimeric substance expressing a heterologous epitope that is recognized by a commercially available antibody.

## ANTIBODIES

In one embodiment of the present invention, the agent of the present invention may be an antibody. In addition, or in the alternative, the target of the present invention may be an antibody.

Antibodies may be produced by standard techniques, such as by immunisation with the substance of the invention or by using a phage display library.

For the purposes of this invention, the term "antibody", unless specified to the contrary, includes but is not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, fragments produced by a Fab expression library, as well as mimetics thereof. Such fragments include fragments of whole antibodies which retain their binding activity for a target substance, Fv, F(ab') and $F(ab')_2$ fragments, as well as single chain antibodies (scFv), fusion proteins and other synthetic proteins which comprise the antigen-binding site of the antibody. Furthermore, the antibodies and fragments thereof may be humanised antibodies. Neutralizing antibodies, i.e., those which inhibit biological activity of the substance polypeptides, are especially preferred for diagnostics and therapeutics.

If polyclonal antibodies are desired, a selected mammal (e.g., mouse, rabbit, goat, horse, etc.) is immunised with an immunogenic polypeptide bearing a epitope(s) obtainable from an identified agent and/or substance of the present invention. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminium hydroxide, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are potentially useful human adjuvants which may be employed if purified the substance polypeptide is administered to immunologically compromised individuals for the purpose of stimulating systemic defence.

Serum from the immunised animal is collected and treated according to known procedures. If serum containing polyclonal antibodies to an epitope obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention contains antibodies to other antigens, the polyclonal antibodies can be purified by immunoaffinity chromatography. Techniques for producing and processing polyclonal antisera are known in the art. In order that such antibodies may be made, the invention also provides polypeptides of the invention or fragments thereof haptenised to another polypeptide for use as immunogens in animals or humans.

Monoclonal antibodies directed against epitopes obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention can also be readily produced by one skilled in the art. The general methodology for making monoclonal antibodies by hybridomas is well known. Immortal antibody-producing cell lines can be created by cell fusion, and also by other techniques such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. Panels of monoclonal antibodies produced against orbit epitopes can be screened for various properties; i.e., for isotype and epitope affinity.

Monoclonal antibodies to the substance and/or identified agent of the present invention may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique originally described by Koehler and Milstein (1975 Nature 256:495-497), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor *et al* (1983) Immunol Today 4:72; Cote *et al* (1983) Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030) and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al* (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer

Therapy, Alan R Liss Inc, pp 77-96). In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (Morrison *et al* (1984) Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855; Neuberger *et al* (1984) Nature 312:604-608; Takeda *et al* (1985) Nature 314:452-454). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (US Patent No. 4,946,779) can be adapted to produce the substance specific single chain antibodies.

Antibodies, both monoclonal and polyclonal, which are directed against epitopes obtainable from an identifed agent and/or substance of the present invention are particularly useful in diagnosis, and those which are neutralising are useful in passive immunotherapy. Monoclonal antibodies, in particular, may be used to raise anti-idiotype antibodies. Anti-idiotype antibodies are immunoglobulins which carry an "internal image" of the substance and/or agent against which protection is desired. Techniques for raising anti-idiotype antibodies are known in the art. These anti-idiotype antibodies may also be useful in therapy.

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in Orlandi *et al* (1989, Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837), and Winter G and Milstein C (1991; Nature 349:293-299).

Antibody fragments which contain specific binding sites for the substance may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, the $F(ab')_2$ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the $F(ab')_2$ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (Huse WD *et al* (1989) Science 256:1275-128 1).

## REPORTERS

A wide variety of reporters may be used in the assay methods (as well as screens) of the present invention with preferred. reporters providing conveniently detectable signals (eg. by spectroscopy). By way of example, a reporter gene may encode an enzyme which catalyses a reaction which alters light absorption properties.

Examples of reporter molecules include but are not limited to β-galactosidase, invertase, green fluorescent protein, luciferase, chloramphenicol, acetyltransferase, β-glucuronidase, exo-glucanase and glucoamylase. Alternatively, radiolabelled or fluorescent tag-labelled nucleotides can be incorporated into nascent transcripts which are then identified when bound to oligonucleotide probes.

In one preferred embodiment, the production of the reporter molecule is measured by the enzymatic activity of the reporter gene product, such as β-galactosidase.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of the target, such as by using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the protein, are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA) and fluorescent activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilising monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on PDE polypeptides is preferred, but a competitive binding assay may be employed. These and other assays are described, among other places, in Hampton R *et al* (1990, Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St Paul MN) and Maddox DE *et al* (1983, J Exp Med 15 8:121 1).

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic and amino acid assays. Means for producing labelled hybridisation or PCR probes for detecting the target polynucleotide sequences include oligolabelling, nick translation, end-labelling or PCR amplification using a labelled nucleotide. Alternatively, the PDE coding sequence, or any portion of it, may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase such as T7, T3 or SP6 and labelled nucleotides.

A number of companies such as Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI), and US Biochemical Corp (Cleveland, OH) supply commercial kits and protocols for these procedures. Suitable reporter molecules or labels include those radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles and the like. Patents teaching the use of such labels include US-A-3817837; US-A-3850752; US-

1040

A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 and US-A-4366241. Also, recombinant immunoglobulins may be produced as shown in US-A-4816567.

Additional methods to quantify the expression of a particular molecule include radiolabeling (Melby PC *et al* 1993 J Immunol Methods 159:235-44) or biotinylating (Duplaa C *et al* 1993 Anal Biochem 229-36) nucleotides, coamplification of a control nucleic acid, and standard curves onto which the experimental results are interpolated. Quantification of multiple samples may be speeded up by running the assay in an ELISA format where the oligomer of interest is presented in various dilutions and a spectrophotometric or calorimetric response gives rapid quantification.

Although the presence/absence of marker gene expression suggests that the gene of interest is also present, its presence and expression should be confirmed. For example, if the nucleotide sequence is inserted within a marker gene sequence, recombinant cells containing the same may be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a target coding sequence under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the target as well.

Alternatively, host cells which contain the coding sequence for the target and express the target coding regions may be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridisation and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane-based, solution-based, or chip-based technologies for the detection and/or quantification of the nucleic acid or protein.

## GENERAL ASSAYS FOR cAMP ACTIVITY/LEVELS

The ability of a test agent to potentiate cAMP may be determined by measuring a relevant increase or decrease of a target level. In addition, or in the alternative, the ability of a test agent to potentiate cAMP may be determined by measuring a relevant increase in cAMP levels. By way of example, one may adapt the teachings of Smith *et al* 1993 (Appl. Biochem. Biotechnol. 41:189-218). There are also commercially available immunoassay kits for the measurement of cAMP (eg Amersham International, Arlington Heights, IL and DuPont, Boston, MA). Details on a suitable cAMP assay are provided in the Experimental Section.

## SCREENS

Any one or more of appropriate targets - such as an amino acid sequence and/or nucleotide sequence - may be used for identifying a $P_{cAMP}$ in any of a variety of drug screening techniques. The target employed in such a test may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The target may even be within an animal model, wherein said target may be an exogenous target or an introduced target. The animal model will be a non-human animal model. The abolition of target activity or the formation of binding complexes between the target and the agent being tested may be measured.

Techniques for drug screening may be based on the method described in Geysen, European Patent Application 84/03564, published on September 13, 1984. In summary, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with a suitable target or fragment thereof and washed. Bound entities are then detected - such as by appropriately adapting methods well known in the art. A purified target can also be coated directly onto plates for use in a drug screening techniques. Alternatively, non-neutralising antibodies can be used to capture the peptide and immobilise it on a solid support.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralising antibodies capable of binding a target specifically compete with a test compound for binding to a target.

Another technique for screening provides for high throughput screening (HTS) of agents having suitable binding affinity to the substances and is based upon the method described in detail in WO 84/03564.

It is expected that the assay methods of the present invention will be suitable for both small and large-scale screening of test compounds as well as in quantitative assays.

Thus, the present invention also relates to a method of identifying agents that potentiate cAMP, the method comprising contacting a suitable target with the agent and then measuring the activity and/or levels of cAMP.

2041

The present invention also relates to a method of identifying agents that selectively potentiate cAMP in female sexual genitalia, the method comprising contacting a suitable target from female sexual genitalia and then measuring the activity and/or levels of cAMP.

The present invention also relates to a method of identifying agents that potentiate cAMP, the method comprising contacting a suitable target with the agent and then measuring the activity and/or levels of the target.

The present invention also relates to a method of identifying agents that selectively potentiate cAMP in female sexual genitalia, the method comprising contacting a suitable target from female sexual genitalia and then measuring the activity and/or levels of the target.

In a preferred aspect, the screen of the present invention comprises at least the following steps (which need not be in this same consecutive order): (a) conducting an *in vitro* screen to determine whether a candidate agent has the relevant activity (such as modulation of PDEII and/or NEP, such as NEP from dog kidney); (b) conducting one or more selectivity screens to determine the selectivity of said candidate agent (e.g. to see if said agent is also an ACE inhibitor – such as by using the assay protocol presented herein); and (c) conducting an *in vivo* screen with said candidate agent (e.g. using a functional animal model). Typically, if said candidate agent passes screen (a) and screen (b) then screen (c) is performed.

## DIAGNOSTICS

The present invention also provides a diagnostic composition or kit for the detection of a pre-disposition for FSAD. In this respect, the composition or kit will comprise an entity that is capable of indicating the presence of one or more - or even the absence of one or more - of the targets in a test sample. Preferably, the test sample is obtained from the female sexual genitalia or a secretion thereof or therefrom.

By way of example, the diagnostic composition may comprise any one of the nucleotide sequences mentioned herein or a variant, homologue, fragment or derivative thereof, or a sequence capable of hybridising to all or part of any one of the nucleotide sequence.

In order to provide a basis for the diagnosis of disease, normal or standard values from a target should be established. This may be accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with an antibody to a target under conditions suitable for complex formation which are well known in the art. The amount of standard complex formation may be quantified by comparing it to a dilution series of positive controls where a known amount of antibody is combined with known concentrations of a purified target. Then, standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from subjects potentially affected by FSAD. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state.

A target itself, or any part thereof, may provide the basis for a diagnostic and/or a therapeutic compound. For diagnostic purposes, target polynucleotide sequences may be used to detect and quantify gene expression in conditions, disorders or diseases in which FSAD may be implicated.

The target encoding polynucleotide sequence may be used for the diagnosis of FSAD resulting from expression of the target. For example, polynucleotide sequences encoding a target may be used in hybridisation or PCR assays of tissues from biopsies or autopsies or biological fluids, to detect abnormalities in target expression. The form of such qualitative or quantitative methods may include Southern or northern analysis, dot blot or other membrane-based technologies; PCR technologies; dip stick, pin or chip technologies; and ELISA or other multiple sample formal technologies. All of these techniques are well known in the art and are in fact the basis of many commercially available diagnostic kits.

Such assays may be tailored to evaluate the efficacy of a particular therapeutic treatment regime and may be used in animal studies, in clinical trials, or in monitoring the treatment of an individual patient. In order to provide a basis for the diagnosis of disease, a normal or standard profile for target expression should be established. This is accomplished by combining body fluids or cell extracts taken from normal subjects, either animal or human, with the target or a portion thereof, under conditions suitable for hybridisation or amplification. Standard hybridisation may be quantified by comparing the values obtained for normal subjects with a dilution series of positive controls run in the same experiment where a known amount of purified target is used. Standard values obtained from normal samples may be compared

2042

with values obtained from samples from subjects potentially affected by a disorder or disease related to expression of the target coding sequence. Deviation between standard and subject values establishes the presence of the disease state. If disease is established, an existing therapeutic agent is administered, and treatment profile or values may be generated. Finally, the assay may be repeated on a regular basis to evaluate whether the values progress toward or return to the normal or standard pattern. Successive treatment profiles may be used to show the efficacy of treatment over a period of several days or several months.

Thus, in one aspect, the present invention relates to the use of a target polypeptide, or variant, homologue, fragment or derivative thereof, to produce anti-target antibodies which can, for example, be used diagnostically to detect and quantify target levels in an FSAD states.

The present invention further provides diagnostic assays and kits for the detection of a target in cells and tissues comprising a purified target which may be used as a positive control, and anti-target antibodies. Such antibodies may be used in solution-based, membrane-based, or tissue-based technologies to detect any disease state or condition related to the expression of target protein or expression of deletions or a variant, homologue, fragment or derivative thereof.

## ASSAY METHODS

The diagnostic compositions and/or methods and/or kits may be used in the following techniques which include but are not limited to; competitive and non-competitive assays, radioimmunoassay, bioluminescence and chemiluminescence assays, fluorometric assays, sandwich assays, immunoradiometric assays, dot blots, enzyme linked assays including ELISA, microtiter plates, antibody coated strips or dipsticks for rapid monitoring of urine or blood, immunohistochemistry and immunocytochemistry.

By way of example, an immunohistochemistry kit may also be used for localization of NEP, PDE or NPY activity in genital tissue. This immunohistochemistry kit permits localization of NEP, PDE or NPY in tissue sections and cultured cells using both light and electron microscopy which may be used for both research and clinical purposes. Such information may be useful for diagnostic and possibly therapeutic purposes in the detection and/or prevention and/or treatment of a FSD, such as FSAD. For each kit the range, sensitivity, precision, reliability, specificity and reproducibility of the assay are established. Intraassay and interassay variation is established at 20%, 50% and 80% points on the standard curves of displacement or activity.

## PROBES

Another aspect of the subject invention is the provision of nucleic acid hybridisation or PCR probes which are capable of detecting (especially those that are capable of selectively selecting) polynucleotide sequences, including genomic sequences, encoding a target coding region or closely related molecules, such as alleles. The specificity of the probe, i.e., whether it is derived from a highly conserved, conserved or non-conserved region or domain, and the stringency of the hybridisation or amplification (high, intermediate or low) will determine whether the probe identifies only naturally occurring target coding sequence, or related sequences. Probes for the detection of related nucleic acid sequences are selected from conserved or highly conserved nucleotide regions of target family members and such probes may be used in a pool of degenerate probes. For the detection of identical nucleic acid sequences, or where maximum specificity is desired, nucleic acid probes are selected from the non-conserved nucleotide regions or unique regions of the target polynucleotides. As used herein, the term "non-conserved nucleotide region" refers to a nucleotide region that is unique to a target coding sequence disclosed herein and does not occur in related family members.

PCR as described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188 provides additional uses for oligonucleotides based upon target sequences. Such oligomers are generally chemically synthesized, but they may be generated enzymatically or produced from a recombinant source. Oligomers generally comprise two nucleotide sequences, one with sense orientation (5'->3') and one with antisense (3'<-5') employed under optimised conditions for identification of a specific gene or condition. The same two oligomers, nested sets of oligomers, or even a degenerate pool of oligomers may be employed under less stringent conditions for detection and/or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

The nucleic acid sequence for a target can also be used to generate hybridisation probes as previously described, for mapping the endogenous genomic sequence. The sequence may be mapped to a particular chromosome or to a specific region of the chromosome using well known techniques. These include *in situ* hybridisation to chromosomal spreads (Verma *et al* (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York City), flow-sorted chromosomal preparations, or artificial chromosome constructions such as YACs, bacterial artificial chromosomes (BACs), bacterial PI constructions or single chromosome cDNA libraries.

*In situ* hybridisation of chromosomal preparations and physical mapping techniques such as linkage analysis using established chromosomal markers are invaluable in extending genetic maps. Examples of genetic maps can be found in Science (1995; 270:410f and 1994; 265:1981f). Often the placement of a gene on the chromosome of another mammalian species may reveal associated markers even if the number or arm of a particular human chromosome is not known. New sequences can be assigned to chromosomal arms, or parts thereof, by physical mapping. This provides valuable information to investigators searching for disease genes using positional cloning or other gene discovery techniques. Once a disease or syndrome has been crudely localised by genetic linkage to a particular genomic region any sequences mapping to that area may represent associated or regulatory genes for further investigation. The nucleotide sequence of the subject invention may also be used to detect differences in the chromosomal location due to translocation, inversion, etc. between normal, carrier or affected individuals.

## HOST CELLS

The term "host cell" - in relation to the present invention includes any cell that could comprise the target for the agent of the present invention.

Thus, a further embodiment of the present invention provides host cells transformed or transfected with a polynucleotide that is or expresses the target of the present invention. Preferably said polynucleotide is carried in a vector for the replication and expression of polynucleotides that are to be the target or are to express the target. The cells will be chosen to be compatible with the said vector and may for example be prokaryotic (for example bacterial), fungal, yeast or plant cells.

The gram-negative bacterium *E. coli* is widely used as a host for heterologous gene expression. However, large amounts of heterologous protein tend to accumulate inside the cell. Subsequent purification of the desired protein from the bulk of *E.coli* intracellular proteins can sometimes be difficult.

In contrast to *E.coli*, bacteria from the genus *Bacillus* are very suitable as heterologous hosts because of their capability to secrete proteins into the culture medium. Other bacteria suitable as hosts are those from the genera *Streptomyces* and *Pseudomonas*.

Depending on the nature of the polynucleotide encoding the polypeptide of the present invention, and/or the desirability for further processing of the expressed protein, eukaryotic hosts such as yeasts or other fungi may be preferred. In general, yeast cells are preferred over fungal cells because they are easier to manipulate. However, some proteins are either poorly secreted from the yeast cell, or in some cases are not processed properly (e.g. hyperglycosylation in yeast). In these instances, a different fungal host organism should be selected.

Examples of suitable expression hosts within the scope of the present invention are fungi such as *Aspergillus* species (such as those described in EP-A-0184438 and EP-A-0284603) and *Trichoderma* species; bacteria such as *Bacillus* species (such as those described in EP-A-0134048 and EP-A-0253455), *Streptomyces* species and *Pseudomonas* species; and yeasts such as *Kluyveromyces* species (such as those described in EP-A-0096430 and EP-A-0301670) and *Saccharomyces* species. By way of example, typical expression hosts may be selected from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger var. tubigenis*, *Aspergillus niger var. awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus orvzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*.

The use of suitable host cells - such as yeast, fungal and plant host cells - may provide for post-translational modifications (e.g. myristoylation, glycosylation, truncation, lapidation and tyrosine, serine or threonine phosphorylation) as may be needed to confer optimal biological activity on recombinant expression products of the present invention.

## ORGANISM

The term "organism" in relation to the present invention includes any organism that could comprise the target according to the present invention and/or products obtained therefrom. Examples of organisms may include a fungus, yeast or a plant.

2041

The term "transgenic organism" in relation to the present invention includes any organism that comprises the target according to the present invention and/or products obtained.

TRANSFORMATION OF HOST CELLS/HOST ORGANISMS

As indicated earlier, the host organism can be a prokaryotic or a eukaryotic organism. Examples of suitable prokaryotic hosts include *E. coli* and *Bacillus subtilis*. Teachings on the transformation of prokaryotic hosts is well documented in the art, for example see Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) and Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

If a prokaryotic host is used then the nucleotide sequence may need to be suitably modified before transformation - such as by removal of introns.

In another embodiment the transgenic organism can be a yeast. In this regard, yeast have also been widely used as a vehicle for heterologous gene expression. The species *Saccharomyces cerevisiae* has a long history of industrial use, including its use for heterologous gene expression. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* has been reviewed by Goodey et al (1987, Yeast Biotechnology, D R Berry et al, eds, pp 401-429, Allen and Unwin, London) and by King et al (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E F Walton and G T Yarronton, eds, pp 107-133, Blackie, Glasgow).

For several reasons *Saccharomyces cerevisiae* is well suited for heterologous gene expression. First, it is non-pathogenic to humans and it is incapable of producing certain endotoxins. Second, it has a long history of safe use following centuries of commercial exploitation for various purposes. This has led to wide public acceptability. Third, the extensive commercial use and research devoted to the organism has resulted in a wealth of knowledge about the genetics and physiology as well as large-scale fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*.

A review of the principles of heterologous gene expression in Saccharomyces cerevisiae and secretion of gene products is given by E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", Yeasts, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.).

Several types of yeast vectors are available, including integrative vectors, which require recombination with the host genome for their maintenance, and autonomously replicating plasmid vectors.

In order to prepare the transgenic Saccharomyces, expression constructs are prepared by inserting the nucleotide sequence of the present invention into a construct designed for expression in yeast. Several types of constructs used for heterologous expression have been developed. The constructs contain a promoter active in yeast fused to the nucleotide sequence of the present invention, usually a promoter of yeast origin, such as the GAL1 promoter, is used. Usually a signal sequence of yeast origin, such as the sequence encoding the SUC2 signal peptide, is used. A terminator active in yeast ends the expression system.

For the transformation of yeast several transformation protocols have been developed. For example, a transgenic Saccharomyces according to the present invention can be prepared by following the teachings of Hinnen et al (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929); Beggs, J D (1978, Nature, London, 275, 104); and Ito, H et al (1983, J Bacteriology 153, 163-168).

The transformed yeast cells are selected using various selective markers. Among the markers used for transformation are a number of auxotrophic markers such as LEU2, HIS4 and TRP1, and dominant antibiotic resistance markers such as aminoglycoside antibiotic markers, eg G418.

Another host organism is a plant. The basic principle in the construction of genetically modified plants is to insert genetic information in the plant genome so as to obtain a stable maintenance of the inserted genetic material. Several techniques exist for inserting the genetic information, the two main principles being direct introduction of the genetic information and introduction of the genetic information by use of a vector system. A review of the general techniques may be found in articles by Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) and Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech March/April 1994 17-27). Further teachings on plant transformation may be found in EP-A-0449375.

2045

Thus, the present invention also provides a method of transforming a host cell with a nucleotide sequence that is to be the target or is to express the target. Host cells transformed with the nucleotide sequence may be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the encoded protein from cell culture. The protein produced by a recombinant cell may be secreted or may be contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing coding sequences can be designed with signal sequences which direct secretion of the coding sequences through a particular prokaryotic or eukaryotic cell membrane. Other recombinant constructions may join the coding sequence to nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins (Kroll *DJ et al* (1993) DNA Cell Biol 12:441-53).

## PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising administering a therapeutically effective amount of the agent of the present invention and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipients (including combinations thereof).

The pharmaceutical compositions may be for human or animal usage in human and veterinary medicine and will typically comprise any one or more of a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, or excipient. Acceptable carriers or diluents for therapeutic use are well known in the pharmaceutical art, and are described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). The choice of pharmaceutical carrier, excipient or diluent can be selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice. The pharmaceutical compositions may comprise as - or in addition to - the carrier, excipient or diluent any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s), solubilising agent(s).

Preservatives, stabilizers, dyes and even flavoring agents may be provided in the pharmaceutical composition. Examples of preservatives include sodium benzoate, sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid. Antioxidants and suspending agents may be also used.

There may be different composition/formulation requirements dependent on the different delivery systems. By way of example, the pharmaceutical composition of the present invention may be formulated to be delivered using a mini-pump or by a mucosal route, for example, as a nasal spray or aerosol for inhalation or ingestable solution, or parenterally in which the composition is formulated by an injectable form, for delivery, by, for example, an intravenous, intramuscular or subcutaneous route. Alternatively, the formulation may be designed to be delivered by both routes.

Where the agent is to be delivered mucosally through the gastrointestinal mucosa, it should be able to remain stable during transit though the gastrointestinal tract; for example, it should be resistant to proteolytic degradation, stable at acid pH and resistant to the detergent effects of bile.

Where appropriate, the pharmaceutical compositions can be administered by inhalation, in the form of a suppository or pessary, topically in the form of a lotion, solution, cream, ointment or dusting powder, by use of a skin patch, orally in the form of tablets containing excipients such as starch or lactose, or in capsules or ovules either alone or in admixture with excipients, or in the form of elixirs, solutions or suspensions containing flavouring or colouring agents, or they can be injected parenterally, for example intravenously, intramuscularly or subcutaneously. For parenteral administration, the compositions may be best used in the form of a sterile aqueous solution which may contain other substances, for example enough salts or monosaccharides to make the solution isotonic with blood. For buccal or sublingual administration the compositions may be administered in the form of tablets or lozenges which can be formulated in a conventional manner.

For some embodiments, the agents of the present invention may also be used in combination with a cyclodextrin. Cyclodextrins are known to form inclusion and non-inclusion complexes with drug molecules. Formation of a drug-cyclodextrin complex may modify the solubility, dissolution rate, bioavailability and/or stability property of a drug molecule. Drug-cyclodextrin complexes are generally useful for most dosage forms and administration routes. As an alternative to direct complexation with the drug the cyclodextrin may be used as an auxiliary additive, e.g. as a carrier, diluent or solubiliser. Alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins are most commonly used and suitable examples are described in WO-A-91/11172, WO-A-94/02518 and WO-A-98/55148.

2046

In a preferred embodiment, the asents of the present invention are delivered systemically (such as orally, buccally, sublingually), more preferably orally.

Hence, preferably the agent is in a form that is suitable for oral delivery.

For some embodiments, preferably the agent - when in use - does not act on the central nervous system.

For some embodiments, preferably the agent - when in use - is peripherally acting.

## ADMINISTRATION

The term "administered" includes delivery by viral or non-viral techniques. Viral delivery mechanisms include but are not limited to adenoviral vectors, adeno-associated viral (AAV) vectos, herpes viral vectors, retroviral vectors, lentiviral vectors, and baculoviral vectors. Non-viral delivery mechanisms include lipid mediated transfection, liposomes, immunoliposomes, lipofectin, cationic facial amphiphiles (CFAs) and combinations thereof.

The agents of the present invention may be administered alone but will generally be administered as a pharmaceutical composition – e.g. when the agent is in admixture with a suitable pharmaceutical excipient, diluent or carrier selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice.

For example, the agent can be administered (e.g. orally or topically) in the form of tablets, capsules, ovules, elixirs, solutions or suspensions, which may contain flavouring or colouring agents, for immediate-, delayed-, modified-, sustained-, pulsed- or controlled-release applications.

The tablets may contain excipients such as microcrystalline cellulose, lactose, sodium citrate, calcium carbonate, dibasic calcium phosphate and glycine, disintegrants such as starch (preferably corn, potato or tapioca starch), sodium starch glycollate, croscarmellose sodium and certain complex silicates, and granulation binders such as polyvinylpyrrolidone, hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), hydroxypropylcellulose (HPC), sucrose, gelatin and acacia. Additionally, lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, glyceryl behenate and talc may be included.

Solid compositions of a similar type may also be employed as fillers in gelatin capsules. Preferred excipients in this regard include lactose, starch, a cellulose, milk sugar or high molecular weight polyethylene glycols. For aqueous suspensions and/or elixirs, the agent may be combined with various sweetening or flavouring agents, colouring matter or dyes, with emulsifying and/or suspending agents and with diluents such as water, ethanol, propylene glycol and glycerin, and combinations thereof.

The routes for administration (delivery) include, but are not limited to, one or more of: oral (e.g. as a tablet, capsule, or as an ingestable solution), topical, mucosal (e.g. as a nasal spray or aerosol for inhalation), nasal, parenteral (e.g. by an injectable form), gastrointestinal, intraspinal, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, intrauterine, intraocular, intradermal, intracranial, intratracheal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutaneous, ophthalmic (including intravitreal or intracameral), transdermal, rectal, buccal, vaginal, epidural, sublingual.

It is to be understood that not all of the agent need be administered by the same route. Likewise, if the composition comprises more than one active component, then those components may be administered by different routes.

If the agent of the present invention is administered parenterally, then examples of such administration include one or more of: intravenously, intra-arterially, intraperitoneally, intrathecally, intraventricularly, intraurethrally, intrasternally, intracranially, intramuscularly or subcutaneously administering the agent; and/or by using infusion techniques.

For parenteral administration, the agent is best used in the form of a sterile aqueous solution which may contain other substances, for example, enough salts or glucose to make the solution isotonic with blood. The aqueous solutions should be suitably buffered (preferably to a pH of from 3 to 9), if necessary. The preparation of suitable parenteral formulations under sterile conditions is readily accomplished by standard pharmaceutical techniques well-known to those skilled in the art.

As indicated, the agent of the present invention can be administered intranasally or by inhalation and is conveniently delivered in the form of a dry powder inhaler or an aerosol spray presentation from a pressurised container, pump, spray or nebuliser

10Ar

with the use of a suitable propellant, e.g. dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, a hydrofluoroalkane such as 1,1,1,2-tetrafluoroethane (HFA 134A™) or 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropane (HFA 227EA™), carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurised aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. The pressurised container, pump, spray or nebuliser may contain a solution or suspension of the active compound, e.g. using a mixture of ethanol and the propellant as the solvent, which may additionally contain a lubricant, e.g. sorbitan trioleate. Capsules and cartridges (made, for example, from gelatin) for use in an inhaler or insufflator may be formulated to contain a powder mix of the agent and a suitable powder base such as lactose or starch.

Alternatively, the agent of the present invention can be administered in the form of a suppository or pessary, or it may be applied topically in the form of a gel, hydrogel, lotion, solution, cream, ointment or dusting powder. The agent of the present invention may also be dermally or transdermally administered, for example, by the use of a skin patch. They may also be administered by the pulmonary or rectal routes. They may also be administered by the ocular route. For ophthalmic use, the compounds can be formulated as micronised suspensions in isotonic, pH adjusted, sterile saline, or, preferably, as solutions in isotonic, pH adjusted, sterile saline, optionally in combination with a preservative such as a benzylalkonium chloride. Alternatively, they may be formulated in an ointment such as petrolatum.

For application topically to the skin, the agent of the present invention can be formulated as a suitable ointment containing the active compound suspended or dissolved in, for example, a mixture with one or more of the following: mineral oil, liquid petrolatum, white petrolatum, propylene glycol, polyoxyethylene polyoxypropylene compound, emulsifying wax and water. Alternatively, it can be formulated as a suitable lotion or cream, suspended or dissolved in, for example, a mixture of one or more of the following: mineral oil, sorbitan monostearate, a polyethylene glycol, liquid paraffin, polysorbate 60, cetyl esters wax, cetearyl alcohol, 2-octyldodecanol, benzyl alcohol and water.

The compositions of the present invention may be administered by direct injection.

For some applications, preferably the agent is administered orally.

For some applications, preferably the agent is administered topically.

## DOSE LEVELS

Typically, a physician will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual subject. The specific dose level and frequency of dosage for any particular patient may be varied and will depend upon a variety of factors including the activity of the specific compound employed, the metabolic stability and length of action of that compound, the age, body weight, general health, sex, diet, mode and time of administration, rate of excretion, drug combination, the severity of the particular condition, and the individual undergoing therapy. The agent and/or the pharmaceutical composition of the present invention may be administered in accordance with a regimen of from 1 to 10 times per day, such as once or twice per day.

For oral and parenteral administration to human patients, the daily dosage level of the agent may be in single or divided doses.

Depending upon the need, the agent may be administered at a dose of from 0.01 to 30 mg/kg body weight, such as from 0.1 to 10 mg/kg, more preferably from 0.1 to 1 mg/kg body weight. Naturally, the dosages mentioned herein are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited.

## FORMULATION

The agents of the present invention may be formulated into a pharmaceutical composition, such as by mixing with one or more of a suitable carrier, diluent or excipient, by using techniques that are known in the art.

The following present some non-limiting examples of formulations.

2048

Formulation 1: A tablet is prepared using the following ingredients:

| | weight/mg |
|---|---|
| Agent | 250 |
| Cellulose, microcrystalline | 400 |
| Silicon dioxide, fumed | 10 |
| Stearic acid | 5 |
| Total | 665 |

the components are blended and compressed to form tablets each weighing 665mg.

Formulation 2: An intravenous formulation may be prepared as follows:

| | |
|---|---|
| Agent | 100mg |
| Isotonic saline | 1,000ml |

## PHARMACEUTICALLY ACTIVE SALT

The agent of the present invention may be administered as a pharmaceutically acceptable salt. Typically, a pharmaceutically acceptable salt may be readily prepared by using a desired acid or base, as appropriate. The salt may precipitate from solution and be collected by filtration or may be recovered by evaporation of the solvent.

## ANIMAL TEST MODELS

*In vivo* models may be used to investigate and/or design therapies or therapeutic agents to treat FSAD. The models could be used to investigate the effect of various tools/lead compounds on a variety of paramaters which indicate the sexual arousal response. These animal test models can be used as, or in, the assay of the present invention. The animal test model will be a non-human animal test model.

There are a number of animal models for vasculogenic female sexual dysfunction (FSAD) available that could be used.

By way of example, reference may be made to invasive animal models (e.g. see Park *et al.*, 1997). Here, vaginal and clitoral haemodynamic responses can be directly recorded following pelvic nerve stimulation in normal and atherosclerotic female rabbits (a validated model of FSAD). The *in vivo* effects of cAMP potentiators - such as vasodilatory agents such as NPY antagonist or VIP agonists - can be investigated either in normal or FSAD animals.

By way of further example, reference may be made to non-invasive animal models (e.g. see the review of Goldstein *et al.*, 1998; Laan *et al.*, 1998). Here, pulsed wave Doppler ultrasonography provides a means of detecting blood flow changes in the vaginal and clitoral arteries. This model can be used to investigate vasculogenic effects during pharmacological administration of vasodilators.

Other non-invasive techniques that can be used include vaginal photoplethysmography, which provides a quantitative measure of vaginal mucosa engorgement, and vaginal thermal clearance techniques, which are based on the principle that vaginal blood flow changes can be recorded by measuring the heat transfer away from an intravaginal probe kept at a constant temperature.

In a preferred aspect, a non-invasive model of FSAD is used.

## AN ANIMAL MODEL OF SEXUAL AROUSAL

In our studies we have developed a robust reproducible model of the physiology of sexual arousal. This model uses an anaesthetised rabbit and employs Laser Doppler technologies to monitor genital blood flow whilst routinely recording cardiovascular parameters. We are capable of measuring small changes in vaginal (and even clitoral) blood flow induced by pelvic nerve stimulation or infusion of VIP in the absence and presence of test agents.

We believe that our animal model directly reflects the clinical data. Hence, this model can be used to study candidate agents for the treatment of FSAD, such as measuring enhancement of vaginal or clitoral blood flow.

## PHYSIOLOGICAL MEASUREMENT OF FEMALE SEXUAL AROUSAL

In accordance with the present invention, a number of different techniques may be used for measuring clitoral and vaginal blood flow. By way of example, use may be made of vaginal photoplethysmography, vaginal heat washout technique, clitoral and vaginal contrast-enhanced MRI, clitoral/vulval laser Doppler pulsed imaging, and clitoral ultrasonography.

Quantification of vaginal lubrication may also be measured by techniques known in the art - such as (a) pre- and post-stimulation weighing of vaginal tampons, and (b) measuring the pH of vaginal fluid. With respect to the latter aspect, the normal resting acid medium in the vagina becomes more alkaline as it approaches blood pH when transudation of fluid occurs during sexual stimulation.

## PDE (phosphodiesterase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is a PDE (phosphodiesterase).

It is known that cyclic nucleotides, such as cAMP and cGMP, are important intracellular second messengers. Cyclic nucleotide phosphodiesterases - otherwise known as PDEs - are a family of enzymes that catalyse the degradation of cyclic nucleotides and, in doing so, are one of the cellular components that regulate the concentration of cyclic nucleotides.

In recent years, at least seven PDE enzymes (such as PDEI - PDEVII), as well as many subtypes of these enzymes, have been defined based on substrate affinity and cofactor requirements (Beavo JA and Reifsnyder DH, Trends Pharmacol. Sci. 11:150 [1990]; Beavo J, In: Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action., Beavo J and Housley MD (Eds.). Wiley:Chichester, pp. 3-15 [1990]).

Examples of PDEs include: PDEI which is a $Ca^{2+}$/Calmodulin-dependent PDE; PDEII which is a cAMP and cGMP stimulated PDE; PDEIII which is a cGMP inhibited PDE; PDEIV which is a high affinity cAMP-specific PDE; and PDEV which is a cGMP specific PDE. PDEI etc. are sometimes called PDE type I etc. or PDE type 1 etc.

Each PDE family may contain two or more isoforms (i.e. there may be two or more PDE isoenzymes). By way of example, mammalian PDE IV, the homologue of the *Drosophila* Dunce gene (Chen CN *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 83:9313 [1986]), is known to have four isoforms in the rat (Swinnen JV *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 86:5325 [1989]). Human PDEs are also known to occur as isoforms and have splice variants. For example, the cloning of one human isoform of PDEIV from monocytes was reported in 1990 (Livi GP *et al.*, Mol. Cell. Bio., 10:2678 [1990]). By way of further example, other workers have independently cloned three splice variants of PDEIV, which are now designated hPDEIV-B1, hPDEIV-B2, and hPDEIV-B3.

Teachings on cyclic nucleotide phosphodiesterases can also be found in US-A-5932423 and US-A-5932465.

Teachings on a further cyclic nucleotide phosphodiesterase - namely CN PCDE8 - can be found in WO-A-97/35989. According to WO-A-97/35989, CN PCDE8 has two isozymes - which were designated CN PCDE8A and CN PCDE8B. The term "isozyme" is sometimes referred to in the art as "isoform".

According to WO-A-97/35989, many inhibitors of different PDEs have been identified and some have undergone clinical evaluation. For example, PDEIII inhibitors are being developed as antithrombotic agents, as antihypertensive agents and as cardiotonic agents useful in the treatment of congestive heart failure. Rolipram, a PDEIII inhibitor, has been used in the treatment of depression and other inhibitors of PDEIII are undergoing evaluation as anti-inflammatory agents. Rolipram has also been shown to inhibit lipopolysaccharide (LPS) induced TNF-alpha which has been shown to enhance HIV-1 replication *in vitro*. Therefore, rolipram may inhibit HIV-1 replication (Angel *et al* 1995 AIDS 9:1137-44). Additionally, based on its ability to suppress the production of TNF alpha and beta and interferon gamma, rolipram has been shown to be effective in the treatment of encephalomyelitis, the experimental animal model for multiple sclerosis (Sommer *et al*, 1995 Nat Med 1:244-248) and may be effective in the treatment of tardive dyskinesia (Sasaki *et al*, 1995 Eur J Phamacol 282:71-76).

According to WO-A-97/35989, there are also non-specific PDE inhibitors such as theophylline, used in the treatment of bronchial asthma and other respiratory diseases, and pentoxifylline, used in the treatment of intermittent claudication and diabetes-induced peripheral vascular disease. Theophylline is thought to act on airway smooth muscle function as well as in an anti-inflammatory or immunomodulatory capacity in the treatment of respiratory diseases (Banner *et al* 1995 Respir J 8:996-1000) where it is thought to act by inhibiting both CN PDE cAMP and cGMP hydrolysis (Banner *et al* 1995 Monaldi Arch Chest Dis 50:286-292). Pentoxifylline, also known to block TNF-alpha production, may inhibit HIV-1 replication (Angel *et al supra*). A list of CN PDE inhibitors is given in Beavo 1995 *supra*.

It has been suggested that selective inhibitors of PDEs, in addition to their isozymes and their subtypes, will lead to more effective therapy with fewer side effects. For example, see the teachings in the reviews of Wieshaar RE *et al*, (J. Med. Chem., 28:537 [1985]), Giembycz MA (Biochem. Pharm., 43:2041 [1992]) and Lowe JA and Cheng JB (Drugs of the Future, 17:799-807 [1992]).

Thus, for some applications it is desirable to have a selective inhibition of an individual type of PDE.

Background teachings on PDEs have been presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning PDE2 or cGMP-stimulated PDE, has been extracted from that source.

> "Cyclic nucleotides serve as second messengers that mediate a variety of cellular responses to extracellular signals such as hormones, light, and neurotransmitters. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) play a role in signal transduction by regulating the cellular concentrations of cyclic nucleotides. Mammalian cells contain multiple PDEs that are distinguished into at least 7 families based on their substrate affinity and on their selective sensitivity to cofactors and inhibitory drugs. These families are: (I) Ca(2+)/calmodulin-dependent PDEs; (II) cGMP-stimulated PDEs; (III) cGMP-inhibited PDEs; (IV) cAMP-specific PDEs; (V) cGMP-specific PDEs; (VI) photoreceptor PDEs; and (VII) high-affinity, cAMP-specific. From the amino acid sequences, it is evident that all these PDE families contain a related domain, thought to be the catalytic domain, with approximately 30% sequence identity between families. Members of the same family are more closely related; they share 60 to 80% sequence identity throughout the entire coding region.
>
> Michaeli et al. (1993) established a highly sensitive functional screen for the isolation of cDNAs encoding cAMP phosphodiesterases by complementation of defects in the Saccharomyces cerevisiae strain lacking both endogenous cAMP PDE genes, PDE1 and PDE2. Three groups of cDNAs corresponding to 3 distinct human genes

> encoding cAMP-specific PDEs were isolated from a human glioblastoma cDNA library using this functional screen. Two of the genes were closely related to the Drosophila 'dunce' cAMP-specific PDE. The third gene, which Michaeli et al. (1993) referred to as HCP1, encoded a novel cAMP-specific PDE. HCP1 had an amino acid sequence related to the sequences of the catalytic domains of all cyclic nucleotide PDEs. It is a high-affinity cAMP-specific PDE that does not share other properties of the cAMP-specific PDE family, however. The PDE activity of HCP1 was not sensitive to cGMP or other inhibitors of the cGMP-inhibitable PDEs. The biochemical and pharmacologic properties of HCP1 suggested to Michaeli et al. (1993) that it is a member of a previously undiscovered cyclic nucleotide PDE family, which they designated as family VII. Northern blot analysis indicated the presence of high levels of an HCP1 RNA in human skeletal muscle.
>
> By Southern blot analysis of somatic cell hybrid lines, Milatovich et al. (1994) mapped the HCP1 locus to chromosome 8; by study of somatic cell hybrid lines that contained different regions of chromosome 8, they regionalized the assignment to 8q13-q22. Han et al. (1998) mapped the PDE7A gene to 8q13 by fluorescence in situ hybridization. By interspecific backcross analysis, they mapped the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3."

Background teachings on PDE2 have been presented by Jennifer P. Macke et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning PDE2 cGMP-stimulated has been extracted from that source.

> "Rosman et al. (1997) cloned a cDNA corresponding to human PDE2A. The PDE2A gene encodes a 941 amino acid polypeptide with a predicted molecular mass of 106 kD. The protein sequence is 90% identical to bovine and rat PDE2A sequences. Northern blot analysis showed that PDE2A was expressed as a 4.2-kb mRNA at varying levels in all human tissues tested, with greatest expression in brain. Expression studies revealed that PDE2A hydrolyzes cAMP and cGMP and is inhibited by the PDE2A-specific inhibitor EHNA."

Nucleotide sequences and amino acid sequences for PDEs are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

In one aspect, the PDE target is selected from any one or more of the following PDE enzymes: $PDE_{cAMP}$ 1, $PDE_{cAMP}$ 2, $PDE_{cAMP}$ 3, $PDE_{cAMP}$ 4, $PDE_{cAMP}$ 7 and $PDE_{cAMP}$ 8.

In a more preferred aspect, the PDE target is selected from any one or more of the following PDE enzymes: $PDE_{cAMP}$ 1, $PDE_{cAMP}$ 2, $PDE_{cAMP}$ 3, and $PDE_{cAMP}$ 4.

2051

Preferably, for the present invention, the PDE to target is at least PDE 2.

I:PDE

As indicated above, the agent may be any suitable agent that can act as an I:PDE.

Broad aspects of this aspect of the present invention therefore relate to:

a) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD (preferably FSAD); the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

b) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD (preferably FSAD); wherein said agent is an I:PDE.

c) A method of treating a female suffering from FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

d) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

e) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is an I:PDE.

f) A method of treating a female for FSD (preferably FSAD) or to prevent FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an I:PDE.

Other aspects of the present invention encompass:

A) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

B) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD, and wherein said agent is an I:PDE.

C) A method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

D) An assay method for identifying an agent that can be used to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: determining whether an agent can directly or indirectly potentiate cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD; and wherein said agent is an I:PDE.

E) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:PDE.

F) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; and wherein said agent is an I:PDE.

G) A method of treating a female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the

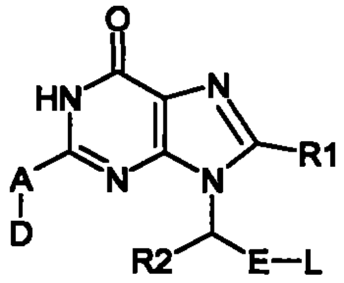
female so as to cause enhanced genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; and wherein said agent is an I:PDE.

Examples of I:PDE are disclosed in EP-A-091133 and EP-A-0771799.

Preferably, the I:PDE is an I:PDE2. Thus, preferred example compounds are those presented in EP-A-0771799.

For convenience, claim 1 of EP-A-0771799 is now repeated:

A purin-6-one derivative with general formula (I):



wherein:

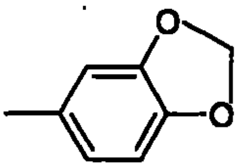
| | |
|---|---|
| $R^1$ | represents hydrogen or a linear or branched alkyl containing up to 8 carbon atoms; |
| $R^2$ | represents a linear or branched acyl containing up to 4 carbon atoms, or a linear or branched alkyl containing up to 8 carbon atoms optionally substituted by hydroxyl, azido or a group with formula $-NR^3R^4$ or $-OSO_2R^5$; wherein |
| $R^3$ and $R^4$ | are identical or different and represent a cycloalkyl containing 3 to 6 carbon atoms, hydrogen, formyl, or a linear or branched alkyl containing up to 6 carbon atoms, optionally substituted by a linear or branched alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 6 carbon atoms or by a group with formula $-(CO)_a-NR^6R^7$, wherein |
| a | is the number 0 or 1; |

| | |
|---|---|
| $R^6$ and $R^7$ | are identical or different and represent hydrogen, formyl, hydroxyl, phenyl or a linear or branched alkyl containing up to 6 carbon atoms, optionally substituted by hydroxyl or a linear or branched alkoxy containing up to 5 carbon atoms; or |
| $R^3$ and/or $R^4$ | represent a linear or branched alkoxycarbonyl containing up to 6 carbon atoms, carboxyl or a linear or branched acyl containing up to 6 carbon atoms optionally substituted by hydroxyl or a linear or branched alkoxy containing up to 4 carbon atoms; or |
| $R^3$ and/or $R^4$ | represent a residue with formula $-(CO)_b\text{-}T\text{-}NR^8R^9$, $-CO\text{-}R^{10}$, $-SO_2R^{11}$ or $-SO_2NR^{12}R^{13}$, wherein |
| b | has the meaning given above for a and is identical thereto or different therefrom; |
| T | can represent a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms, or when $b \neq 0$ it can also represent a bond; |
| $R^8$ and $R^9$ | have the meaning given for $R^6$ and $R^7$ above and are identical thereto or different therefrom; |
| $R^{10}$ | represents a saturated, partially unsaturated or unsaturated 5- to 7-membered heterocycle containing up to 3 heteroatoms selected from S, N and/or O, which can optionally also be substituted on the N function by a linear or branched alkyl, alkoxy or alkoxycarbonyl containing up to 4 carbon atoms, carboxyl, benzyloxycarbonyl or hydroxyl; |
| $R^{11}$ | represents a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms, benzyl or phenyl; |
| $R^{12}$ and $R^{13}$ | are identical or different and represent hydrogen, phenyl or a linear or branched alkyl containing up to 6 carbon atoms; or |

| | |
|---|---|
| $R^3$ and $R^4$ | together with the nitrogen atom form a 5- or 6-membered saturated, partially unsaturated or unsaturated heterocycle which can contain up to 3 heteroatoms selected from N, S and/or O or a $-NR^{14}$ residue, and which is optionally substituted by carbonyl, a linear or branched alkoxycarbonyl containing up to 5 carbon atoms or a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms which in its turn can be substituted by hydroxyl, carboxy or a linear or branched acyl, alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 6 carbon atoms; wherein |
| $R^{14}$ | represents hydrogen, carbonyl or a linear or branched alkyl or alkoxycarbonyl respectively containing up to 5 carbon atoms; and |
| $R^5$ | represents phenyl or a linear or branched alkyl containing up to 5 carbon atoms; |
| A | represents a linear or branched alkylene or alkenylene chain respectively containing up to 6 carbon atoms; |
| D and L | are identical or different and represent an aryl containing 6 to 10 carbon atoms or a 5- to 7-membered aromatic, optionally benzocondensed heterocycle containing up to 3 heteroatoms selected from S, N and/or O, optionally substituted up to 3 times, identically or differently, by a halogen, hydroxyl, nitro, trifluoromethyl, carboxy, a linear or branched alkyl, alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 6 carbon atoms or by a group with formula $-(V)_c-NR^{15}R^{16}$ and/or $-OR^{17}$; wherein |
| c | is the number 0 or 1; |
| V | represents a residue with formula $-CO$ or $-SO_2$; |
| $R^{15}$ and $R^{16}$ | are identical or different and have the meaning given for $R^3$ and $R^4$ above; |

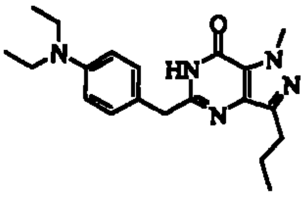
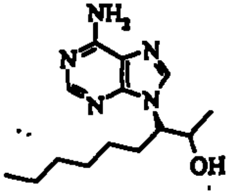
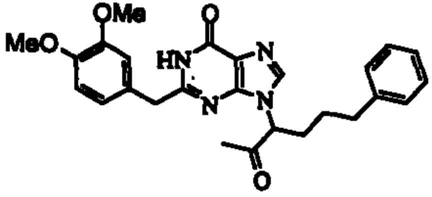
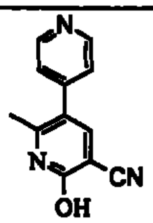
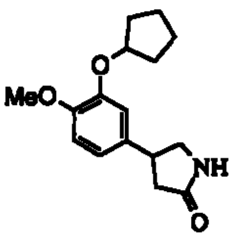
| | |
|---|---|
| $R^{17}$ | represents hydrogen, a linear or branched alkenyl containing up to 8 carbon atoms or a linear or branched alkyl containing up to 8 carbon atoms, optionally substituted up to 3 times, identically or differently, with hydroxyl, carbonyl or linear or branched alkoxycarbonyl containing up to 5 carbon atoms; and/or the cycles are optionally substituted by an aryl containing 6 to 10 carbon atoms or by a 5- to 7-membered aromatic, optionally benzocondensed heterocycle containing up to 3 heteroatoms selected from S, N and/or O, which in its turn is optionally substituted up to two times, identically or differently, by a halogen, hydroxyl, nitro, carboxyl, trifluoromethyl or a linear or branched alkyl, alkoxy or alkoxycarbonyl respectively containing up to 5 carbon atoms or with a group with formula$(V')_d$-$NR^{18}R^{19}$; wherein |
| d | has the meaning given above for a and is identical thereto or different therefrom; |
| $R^{18}$ and $R^{19}$ | have the meaning given above for $R^3$ and $R^4$ and are identical thereto or different therefrom; |
| V' | has the meaning given above for V and is identical thereto or different therefrom; and/or |
| | represents the ring system given below for D, optionally substituted by a linear or branched acyl containing up to 5 carbon atoms, optionally substituted by hydroxyl, a linear or branched alkoxy containing up to 5 carbon atoms or by a group with formula $-NR^{20}R^{21}$; wherein |
| $R^{20}$ and $R^{21}$ | are identical or different and have the meaning given above for $R^3$ and $R^4$; or |
| E | Represents a residue with formula $-CH_2$-Y-Z-; wherein |
| Y | Represents a bond or an oxygen or sulphur atom or the group –NH-; |
| Z | Represents a linear or branched alkyl chain containing up to 5 carbon atoms; |

D represents a residue with formula



and tautomers and salts thereof.

Preferred I:PDEs are selected from the following structures:

| **Compound** | **Structure** | **Mode of action**<br>**References** |
|---|---|---|
| | | |
| **FIa** |  | I:PDE1<br>EP-A-0911333<br>(Example 50) |
| **FIb** |  | I:PDE2<br>EHNA<br>(also an inhibitor of Adenosinedeaminase) |
| FII |  | I:PDE2<br>EP-A-0771799<br>(Example 100) |
| FIII |  | I:PDE3<br>Milrinone<br>(which is commercially available) |
| FIV |  | I:PDE4<br>Rolipram<br>(which is commercially available) |

NEP (neutral endopeptidase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is NEP.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for NEP is available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

In one aspect, the NEP is NEP (EC 3.4.24.11) (also known as enkephalinase or endopeptidase-2). Here, we have found NEP EC 3.4.24.11 mRNA and expressed protein in human and rabbit vagina.

Here, we believe that in females including those suffering from FSAD, VIP is degraded by NEP EC3.4.24.11. Thus, NEP inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of VIP released during arousal. This will lead to a treatment of FSAD, such as through enhanced vaginal engorgement. We have shown that selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 enhance pelvic nerve-stimulated and VIP-induced increases in genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow. In addition that selective NEP inhibitors enhance VIP and nerve-mediated relaxations of isolated vagina wall.

Background teachings on NEP have been presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following information concerning NEP has been extracted from that source.

> "Common acute lymphocytic leukemia antigen is an important cell surface marker in the diagnosis of human acute lymphocytic leukemia (ALL). It is present on leukemic cells of pre-B phenotype, which represent 85% of cases of ALL. CALLA is not restricted to leukemic cells, however, and is found on a variety of normal tissues. CALLA is a glycoprotein that is particularly abundant in kidney, where it is present on the brush border of proximal tubules and on glomerular epithelium. Letarte et al. (1988) cloned a cDNA coding for CALLA and showed that the amino acid sequence deduced from the cDNA sequence is identical to that of human membrane-associated neutral endopeptidase (NEP; EC 3.4.24.11 ), also known as enkephalinase. NEP cleaves peptides at the amino side of hydrophobic residues and inactivates several peptide hormones including glucagon, enkephalins, substance P, neurotensin, oxytocin, and bradykinin. By cDNA transfection analysis, Shipp et al. (1989) confirmed that CALLA is a functional neutral endopeptidase of the type that has

7055

previously been called enkephalinase. Barker et al. (1989) demonstrated that the CALLA gene, which encodes a 100-kD type II transmembrane glycoprotein, exists in a single copy of greater than 45 kb which is not rearranged in malignancies expressing cell surface CALLA. The gene was located to human chromosome 3 by study of somatic cell hybrids and in situ hybridization regionalized the location to 3q21-q27. Tran-Paterson et al. (1989) also assigned the gene to chromosome 3 by Southern blot analysis of DNA from human-rodent somatic cell hybrids. D'Adamio et al. (1989) demonstrated that the CALLA gene spans more than 80 kb and is composed of 24 exons."

## I:NEP

As indicated above, the agent may be any suitable agent that can act as an I:NEP.

Broad aspects of this aspect of the present invention therefore relate to:

a) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD (preferably FSAD); the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NEP.

b) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD (preferably FSAD); wherein said agent is an I:NEP.

c) A method of treating a female suffering from FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NEP.

d) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NEP.

e) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is an I:NEP.

f) A method of treating a female for FSD (preferably FSAD) or to prevent FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an I:NEP.

Other preferred aspects of the present invention encompass:

A) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NEP.

B) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD, and wherein said agent is an I: NEP.

C) A method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I: NEP.

D) An assay method for identifying an agent that can be used to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: determining whether an agent can directly or indirectly potentiate cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD; and wherein said agent is an I: NEP.

E) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female;

2056

wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I: NEP.

F) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; and wherein said agent is an I: NEP.

G) A method of treating a female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the female so as to cause enhanced genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; and wherein said agent is an I: NEP.

Details on a suitable assay system for identifying and/or studying an I:NEP are presented in the following section.

I:NEPs are discussed in the following review articles:

Pathol. Biol., 46(3), 1998, 191.
Current Pharm. Design, 2(5), 1996, 443.
Biochem. Soc. Trans., 21(3), 1993, 678.
Handbook Exp. Pharmacol., 104/1, 1993, 547.
TiPS, 11, 1990, 245.
Pharmacol. Rev., 45(1), 1993, 87.
Curr. Opin. Inves. Drugs, 2(11), 1993, 1175.
Antihypertens. Drugs, (1997), 113.
Chemtracts, (1997), 10(11), 804.
Zinc Metalloproteases Health Dis. (1996), 105.
Cardiovasc. Drug Rev., (1996), 14(2), 166.
Gen. Pharmacol., (1996), 27(4), 581.
Cardiovasc. Drug Rev., (1994), 12(4), 271.
Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., (1995), 22(1), 63.
Cardiovasc. Drug Rev., (1991), 9(3), 285.
Exp. Opin. Ther. Patents (1996), 6(11), 1147.

I:NEPs are disclosed in the following documents:

EP-509442A
US-192435
US-4929641
EP-599444B
US-884664
EP-544620A
US-798684
J. Med. Chem. 1993, 3821.
Circulation 1993, 88(4), 1.
EP-136883
JP-85136554
US-4722810
Curr. Pharm. Design, 1996, 2, 443.
EP-640594
J. Med. Chem. 1993, 36(1), 87.
EP-738711-A
JP-270957
CAS # 115406-23-0
DE-19510566
DE-19638020
EP-830863
JP-98101565
EP-733642
WO9614293
JP-08245609
JP-96245609
WO9415908
JP05092948
WO-9309101
WO-9109840
EP-519738
EP-690070
J. Med. Chem. (1993), 36, 2420.
JP-95157459
Bioorg. Med. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65.

Preferred I:NEPs are disclosed in the following documents:

EP-A-0274234

JP-88165353

Biochem.Biophys.Res. Comm.,1989, 164, 58

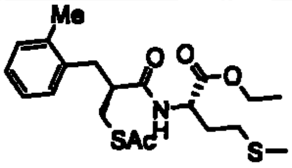
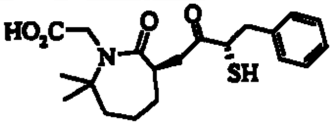
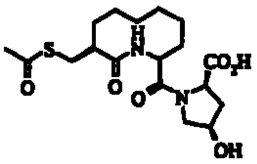
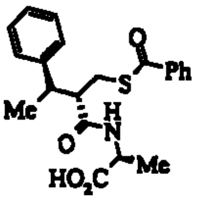
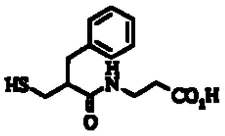
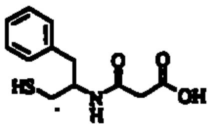
EP-629627-A

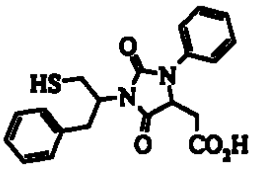
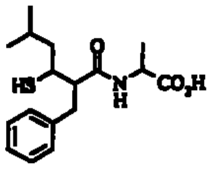
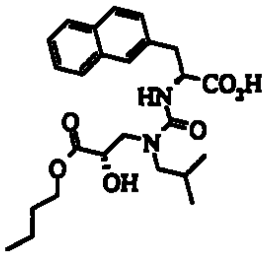
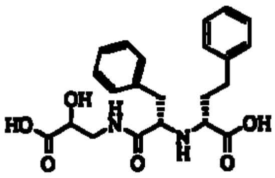
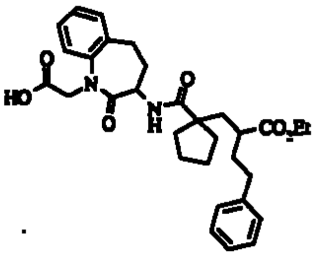
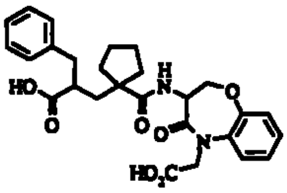
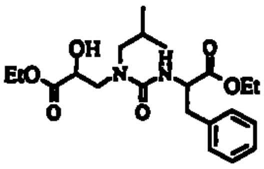
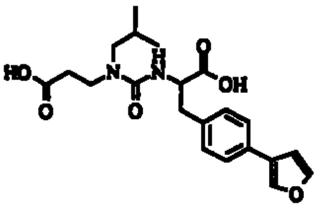
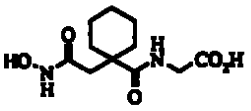
US-77978

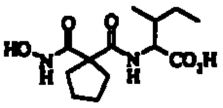
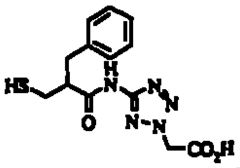
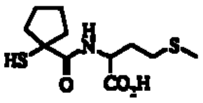
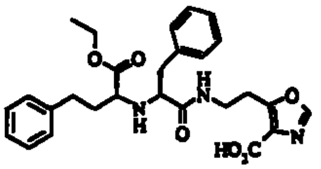
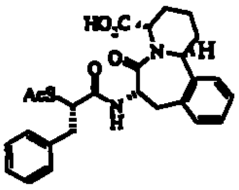
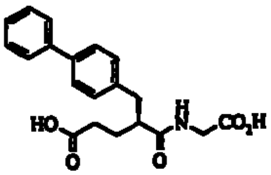
Perspect. Med. Chem. (1993), 45.

EP-358398-B

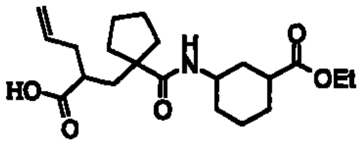
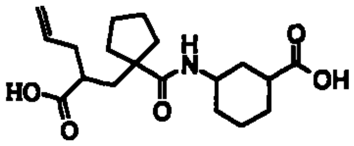
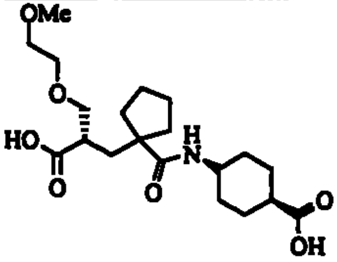
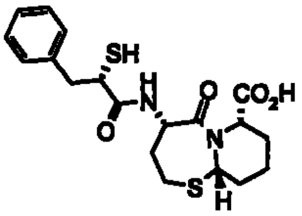
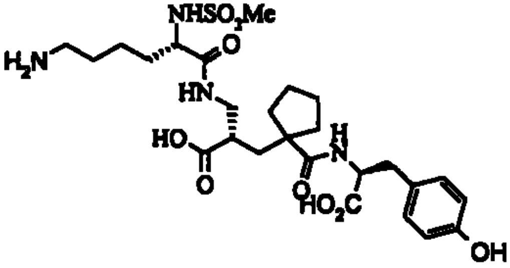
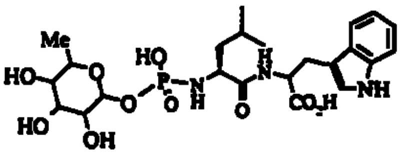
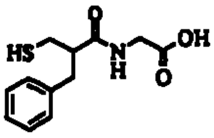
Preferred examples of I:NEPs are selected from the following structures:

| Compound | Structure | Mode of Action<br>References |
|---|---|---|
| | | |
| FXII |  | I:NEP<br>EP-509442A<br>US-192435<br>US-4929641 |
| FXIII |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>EP-599444B<br>US-884664 |
| FXIV |  | I:NEP<br>EP-544620A<br>US-798684<br>J. Med. Chem.<br>1993, 3821. |
| FXV |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>Mixanpril<br>Circulation<br>1993, 88(4), 1. |
| FXVI |  | I:NEP<br>EP-136883<br>JP-85136554<br>US-4722810 |
| FXVII |  | I:NEP<br>Retrothiorphan<br>Curr. Pharm. Design,<br>1996, 2, 443. |

| | | |
|---|---|---|
| FXVIII |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>EP-640594 |
| FXIX |  | I:NEP<br>J. Med. Chem.<br>1993, 36(1), 87. |
| FXX |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>EP-738711-A<br>JP-270957 |
| FXXI |  | I:NEP<br>CAS #<br>115406-23-0 |
| FXXII |  | I:NEP<br>(also an ECE inhibitor)<br>DE-19510566<br>DE-19638020<br>EP-830863<br>JP-98101565 |
| FXXIII |  | I:NEP<br>(also an ECE inhibitor)<br>EP-733642 |
| FXXIV |  | I:NEP<br>WO96/14293 |
| FXXV |  | I:NEP<br>JP-08245609<br>JP-96245609 |
| FXXVI |  | I:NEP<br>WO9415908 |

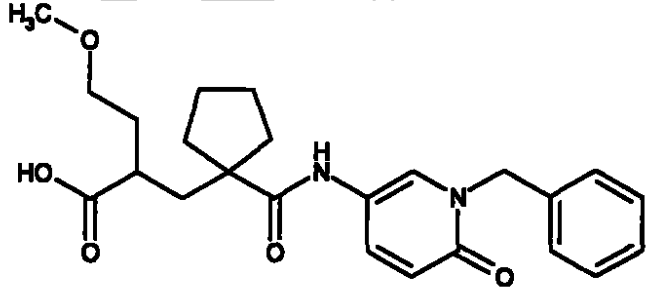
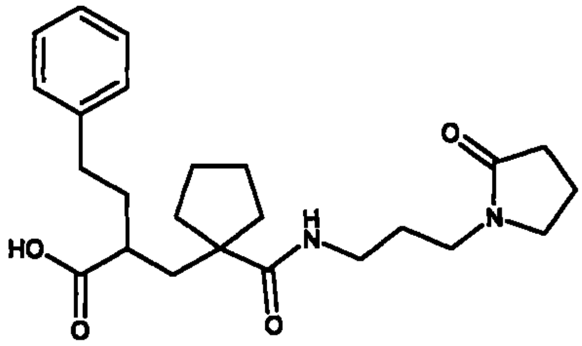
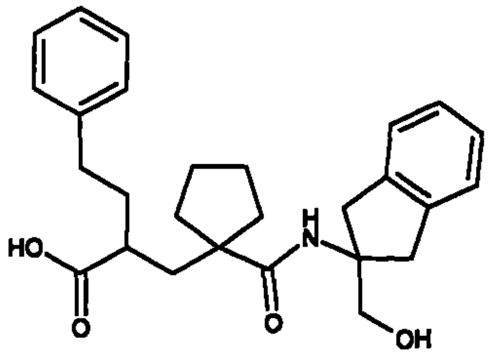
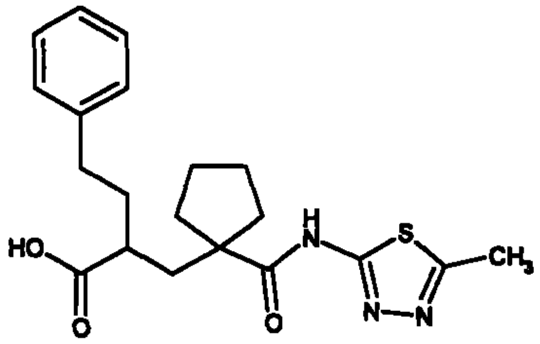
| | | |
|---|---|---|
| FXXVII |  | I:NEP<br>JP05092948 |
| FXXVIII |  | I:NEP<br>WO-9309101 |
| FXXIX |  | I:NEP<br>WO-9109840 |
| FXXXI |  | I:NEP<br>EP-519738<br>EP-690070 |
| FXXXII |  | I:NEP<br>(also an ACE inhibitor)<br>J. Med. Chem. (1993),<br>36, 2420. |
| FXXXIII |  | I:NEP<br>JP-95157459<br>Bioorg. Med. Chem.<br>Letts., 1996, 6(1), 65. |

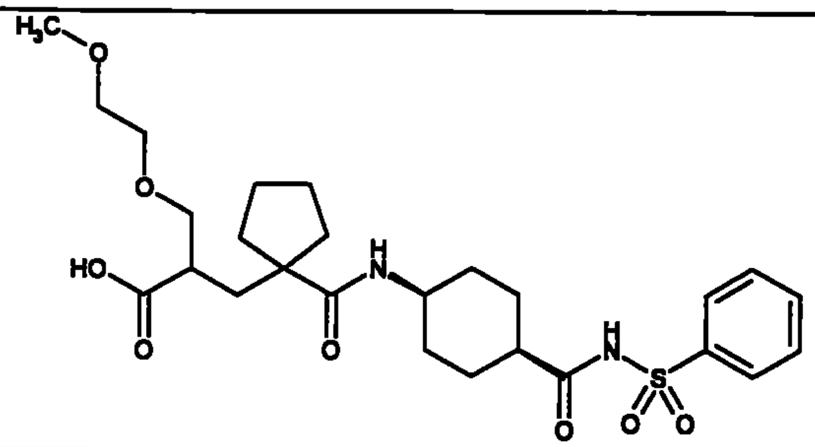
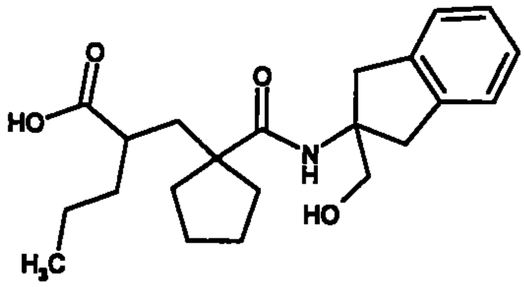
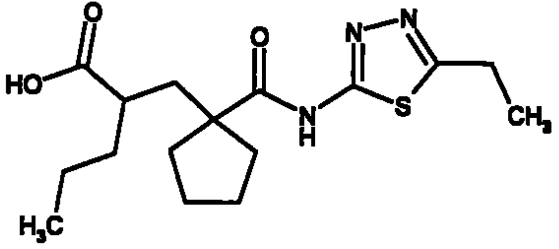
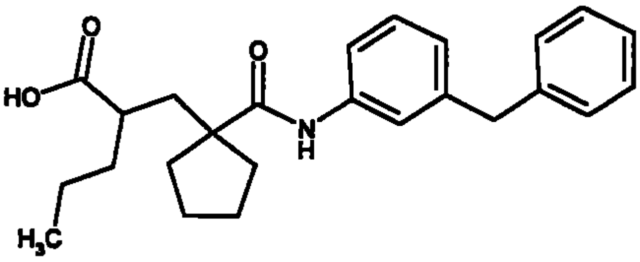
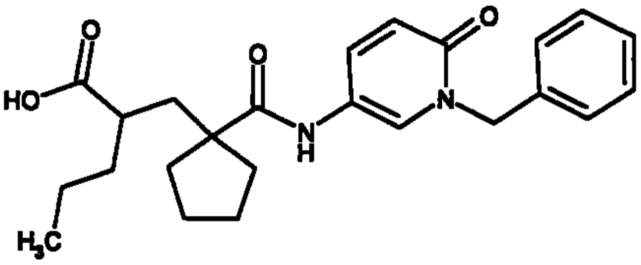
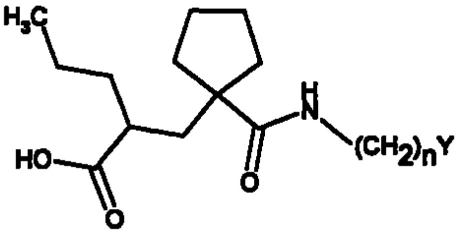
More preferred I:NEPs are selected from the following structures:

| **Compound** | **Structure** | **Mode of Action**<br>**References** |
|---|---|---|
| | | |
| FV |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(Example 300) |
| FVI |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(Example 379) |
| FVII |  | I:NEP<br>Candoxatrilat<br>EP-274234<br>JP-88165353<br>Biochem.Biophys.Res.<br>Comm.,1989, 164, 58 |
| FVIII |  | I:NEP<br>Omapatrilat<br>(also an inhibitor of ACE)<br>EP-0629627-A<br>US-77978 |
| FIX |  | I:NEP<br>Sampatrilat<br>(also an inhibitor of ACE)<br>Perspect. Med. Chem.<br>(1993), 45.<br>EP-0358398-B |
| FX |  | I:NEP<br>Phosphoramidon<br>(which is commercially available) |
| FXI |  | I:NEP<br>Thiorphan<br>(which is commercially available) |

2059 ~~2058~~

More preferred I:NEPs are selected from the following structures:

| COMPOUND | STRUCTURE |
|---|---|
| F57 |  |
| F58 |  |
| F59 |  |
| F60 |  |

| | |
|---|---|
| F61 |  |
| F62 |  |
| F63 |  |
| F64 |  |
| F65 |  |
| F66 | <br>(Ic) |

These compounds were prepared according to the teachings presented in the Experimental section (*infra*). These compounds were tested as agents according to the present invention and were found to be useful in potentiating cAMP, and thereby being useful in the treatment of FSAD. Some of the experimental data concerning these compounds are presented in the Experimental section (*infra*).

## NEP ASSAY

## THE PREPARATION AND ASSAY OF SOLUBLE (NEP) NEUTRAL ENDOPEPTIDASE FROM CANINE, RAT, RABBIT AND HUMAN KIDNEY CORTEX.

Soluble NEP is obtained from the kidney cortex and activity is assayed by measuring the rate of cleavage of the NEP substrate Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp to generate its fluorescent product, Abz-D-Arg-Arg.

## EXPERIMENTAL PROCEDURE:-

### 1. MATERIALS

All water is double de ionised.

### 1.1 Tissues

| | |
|---|---|
| Human Kidney | IIAM (Pennsylvania. U.S.A.) |
| Rat Kidney | |
| Rabbit Kidney | |
| Canine Kidney | |

### 1.2 Homogenisation medium

100mM Mannitol and 20mM Tris @ pH 7.1

2.42g Tris (Fisher T/P630/60) is diluted in 1 litre of water and the pH adjusted to 7.1 using 6M HCl at room temperature. To this 18.22g Mannitol (Sigma M-9546) is added.

### 1.3 Tris buffer (NEP buffer).

50ml of 50mM Tris pH 7.4 (Sigma T2663) is diluted in 950ml of water.

### 1.4 Substrate (Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp)

Made to order from SNPE, and is stored as a powder at –20°C. A 2mM stock is made by gently re-suspending the substrate in Tris buffer, this should not be vortexed or sonicated.

600µl aliquots of the 2mM stock are stored at –20 for up to one month. (Medeiros, M.A.S., Franca, M.S.F. et al., (1997), Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 30, 1157-1162).

1.5 Total product

Samples corresponding to 100% substrate to product conversion are included on the plate to enable the % substrate turnover to be determined. The total product is generated by incubating 1ml of 2mM substrate with 20µl of enzyme stock for 24 hours at 37°C.

1.6 Stop solution.

A 300µM stock of Phosphoramidon (Sigma R7385) is made up in NEP buffer and stored in 50µl aliquots at -20.

1.7 Dimethyl sulphoxide (DMSO).

1.8 Magnesium Chloride -$MgCl_2.6H_2O$ (Fisher M0600/53).

1.9 Black 96 well flat bottom assay plates (Costar 3915).

1.10 Topseal A (Packard 6005185).

1.11 Centrifuge tubes

## 2. SPECIFIC EQUIPTMENT

2.1 Sorvall RC-5B centrifuge (SS34 GSA rotor, pre-cooled to 4°C).

2.2 Braun miniprimer mixer.

2.3 Beckman CS-6R centrifuge.

2.4 Fluostar galaxy.

2.5 Wesbart 1589 shaking incubator.

## 3. METHODS

3.1 TISSUE PREPARATION

3.2 Dog, rat, rabbit, and human NEP is obtained from the kidney cortex using a method adapted from Booth, A.G. & Kenny, A.J. (1974) *Biochem. J.* 142, 575-581.

3.3 Frozen kidneys are allowed to thaw at room temperature and the cortex is dissected away from the medulla.

3.4 The cortex is finely chopped and homogenised in approximately 10 volumes of homogenisation buffer (1.2) using a Braun miniprimer (2.2).

3.5 Magnesium chloride (1.8) (20.3mg/gm tissue) is added to the homogenate and stirred in an ice-water bath for 15 minutes.

3.6 The homogenate is centrifuged at 1,500g (3,820rpm) for 12 minutes in a Beckman centrifuge (2.3) before removing the supernatant to a fresh centrifuge tube and discarding the pellet.

3.7 The supernatant is centrifuged at 15,000g (12,100rpm) for 12 minutes in a Sovall centrifuge (2.1) and the supernatant is discarded.

3.8 The pale pink layer on the top of the remaining pellet is removed and re-suspended in homogenisation buffer containing magnesium chloride (9mg MgCl in 5ml buffer per 1g tissue).

3.9 The suspension is centrifuged at 2,200g (4,630rpm) for 12 minutes in a Beckman centrifuge (2.3) before discarding the pellet.

3.10 The supernatant is centrifuged at 15,000g (12,100rpm) for 12 minutes using the Sorvall centrifuge (2.1) and the supernatant is discarded.

3.11 The final pellet is resuspended in homogenisation buffer containing magnesium chloride (0.9mg MgCl in 0.5ml buffer per 1g tissue). A homogenous suspension is obtained using a Braun miniprimer (2.2). This is then frozen down in 100µl aliquots to be assayed for NEP activity.

## 4.0 DETERMINATION OF NEP ACTIVITY

The activity of the previously aliquoted NEP is measured by its ability to cleave the NEP specific peptide substrate.

4.1 A 4% DMSO/NEP buffer solution is made (4mls DMSO in 96mls NEP buffer).

4.2 Substrate, total product, enzyme, and Phosphoramidon stocks are left on ice to thaw.

4.3 50µl of 4% DMSO/NEP buffer solution is added to each well.

4.4 The 2mM substrate stock is diluted 1:40 to make a 50µM solution. 100µl of 50µM substrate is added to each well (final concentration 25µM).

4.5 50µl of a range of enzyme dilutions is added to initiate the reaction (usually 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, and 1:3200 are used). 50µl of NEP buffer is added to blank wells.

4.6 The 2mM total product is diluted 1:80 to make a 25µM solution. 200µl of 25µM product is added to the first four wells of a new plate.

4.7 Plates are incubated at 37oC in a shaking incubator for 60 minutes.

4.8 The 300µM Phosphoramidon stock is diluted 1:100 to 300nM. The reaction is stopped by the addition of 100µl 300nM Phosphoramidon and incubated at 37$^{0}$C in a shaking incubator for 20 minutes before being read on the Fluostar (ex320/em420).

## 5. NEP INHIBITION ASSAYS

5.1 Substrate, total product, enzyme and Phoshoramidon stocks are left on ice to thaw.

5.2 Compound stocks are made up in 100% DMSO and diluted 1:25 in NEP buffer to give a 4% DMSO solution. All further dilutions are carried out in a 4% DMSO solution (4mls DMSO in 96mls NEP buffer).

5.3 50µl of compound in duplicate is added to the 96 well plate and 50µl of 4% DMSO/NEP buffer is added to control and blank wells.

5.4 The 2mM substrate stock is diluted 1:40 in NEP buffer to make a 50µM solution (275µl 2mM substrate to 10.73ml buffer is enough for 1 plate).

5.5 The enzyme stock diluted in NEP buffer (determined from activity checks).

5.6 The 2mM total product stock is diluted 1:80 in NEP buffer to make a 25µM solution. 200µl is added to the first four wells of a separate plate.

5.7 The 300µM Phosphoramidon stock is diluted 1:1000 to make a 300nM stock (11µl Phosphoramidon to 10.99ml NEP buffer.

5.8 To each well in the 96 well plate the following is added:

Table Reagents to be added to 96 well plate.

| | Compound/ DMSO | Tris Buffer | Substrate | NEP enzyme | Total product |
|---|---|---|---|---|---|
| Samples | 2µl compound | 50µl | 100µl | 50µl | None |
| Controls | 2µl DMSO | 50µl | 100µl | 50µl | None |
| Blanks | 2µl DMSO | 100µl | 100µl | None | None |
| Totals | 2µl DMSO | None | None | None | 200µl |

5.9 The reaction is initiated by the addition of the NEP enzyme before incubating at 37°C for 1 hour in a shaking incubator.

5.10 The reaction is stopped with 100µl 300nM Phosphoramidon and incubated at 37°C for 20 minutes in a shaking incubator before being read on the Fluostar (ex320/em420).

## 6. CALCULATIONS

The activity of the NEP enzyme is determined in the presence and absence of compound and expressed as a percentage.

% Control activity (turnover of enzyme):

$$\frac{\text{Mean FU of controls} - \text{Mean FU of blanks}}{\text{Mean FU of totals} - \text{Mean FU of blanks}} \quad \text{X } 100$$

% Activity with inhibitor:

$$\frac{\text{Mean FU of compound} - \text{Mean FU of blanks}}{\text{Mean FU of totals} - \text{Mean FU of blanks}} \quad \text{X } 100$$

Activity expressed as % of control:

$$\frac{\text{\% Activity with inhibitor}}{\text{\% Control activity}} \quad \text{X } 100$$

A sigmoidal dose-response curve is fitted to the % activities (% of control) vs compound concentration and IC50 values calculated using LabStats fit-curve in Excel.

NPY (neuropeptide Y)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is NPY or one of its associated receptors.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for NPY and its receptors are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

Here, we have found that neuropeptide Y (NPY) exerts an inhibitory regulatory influence over vasoactive intestinal peptide (VIP)-mediated vasorelaxation. Thus, inhibition of NPY receptors will result in an increased pelvic nerve and VIP-mediated increases in genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow. Clinically this will lead to increased vaginal and/or clitoral engorgement which will ultimately lead to increased lubrication *via* plasma transudation and increased vaginal compliance. Hence, a suitable target for the treatment of FSAD is NPY or one of its associated receptors.

Thus, in one preferred aspect, the agent is an NPY $Y_1$ $Y_2$ or $Y_5$ antagonist, preferably an oral NPY $Y_1$ $Y_2$ or $Y_5$ antagonist. This agent will treat FSAD by increasing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow and increasing lubrication.

The NPY-mediated antagonism of VIP-induced increases in blood flow therefore represents a potential therapeutic target by which blood flow in the female genital tract can be influenced. The mechanism through which this antagonism occurs is most likely through NPY $Y_1$ receptor-induced $G_{i/o}$ activation. In other physiological systems NPY $Y_1$ receptors have been implicated in mediating vasoconstriction and inhibiting sympathetic transmitter release (Lundberg *et al.*, 1996; a NPY $Y_2$ effect can not be excluded). We believe in the female genital tract that NPY inhibits vasorelaxation via direct inhibition of adenylate cyclase direct inhibiting VIP release or sympathetic neurotransmission.

As indicated, a $P_{cAMP}$ target is one of the NPY receptors.

The neuronal release of NPY regulates the VIP-induced vasorelaxation of the vaginal vascular bed. This most likely occurs *via* a presynaptic mechanism involving NPY $Y_1$ receptors, although a post-synaptic mode of action can not be excluded. An NPY

2063

antagonist will potentiate VIP-induced vasodilation of the vaginal vascular beds. Clinically this will lead to increased vaginal lubrication and compliance *via* vaginal wall engorgement.

NPY receptor expression studies performed by us have identified NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes within the human vagina.

Hence, in one aspect, the $P_{cAMP}$ target is one or more of the NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes.

Background teachings on NPY and it associated receptors have been prepared by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning NPY has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY) is an abundant and widespread peptide in the mammalian nervous system. It shows sequence homology to peptide YY and over 50% homology in amino acid and nucleotide sequence to pancreatic polypeptide (PNP; 167780). NPY is a 36-amino acid peptide. Minth et al. (1984) cloned the NPY gene starting from mRNA of a pheochromocytoma. Takeuchi et al. (1985, 1986) isolated cDNA clones of the NPY and PNP genes from a pheochromocytoma and a pancreatic endocrine tumor, respectively. Using these cDNA probes to analyze genomic DNA from chromosome assignment panels of human-mouse somatic cell hybrids, they then examined the question of whether the genes are syntenic. The studies showed nonsynteny, with NPY on 7pter-7q22 and PNP on 17p11.1-17qter. By studies of a backcross with Mus spretus, Bahary et al. (1991) mapped the homologous NPY gene to mouse chromosome 6. Since mouse chromosome 6 has homology to human 7q, it is likely that the NPY gene in man is located in the region 7cen-q22. Meisler et al. (1987) excluded close linkage between the loci for cystic fibrosis (219700) and neuropeptide Y. Terenghi et al. (1987) determined the distribution of mRNA encoding NPY in neurons of the cerebral cortex in surgical biopsy specimens and postmortem brain by means of in situ hybridization techniques. They showed consistent localization of NPY gene transcription and expression in normal mature cortical neurons. Baker et al. (1995) showed by fluorescence in situ hybridization that the NPY gene is located on 7p15.1 and exists in single copy. They commented that NPY is one of the most highly conserved peptides known, with, for example, only 3 amino acid differences between human and shark. Neuropeptide Y is a neuromodulator implicated in the control of energy balance and is overproduced in the hypothalamus of ob/ob mice. To determine the role of NPY in the response to leptin (164160) deficiency, Erickson et al. (1996) generated ob/ob mice deficient in

NPY. In the absence of NPY, ob/ob mice were less obese because of reduced food intake and increased energy expenditure, and were less severely affected by diabetes, sterility, and somatotropic defects. These results were interpreted as indicating that NPY is a central effector of leptin deficiency. Genetic linkage analysis of rats that were selectively bred for alcohol preference identified a chromosomal region that included the NPY gene (Carr et al., 1998). Alcohol-preferring rats had lower levels of NPY in several brain regions compared with alcohol-nonpreferring rats. Thiele et al. (1998) therefore studied alcohol consumption by mice that completely lacked NPY as a result of targeted gene disruption (Erickson et al., 1996). They found that NPY-deficient mice showed increased consumption, compared with wildtype mice, of solutions containing 6%, 10%, and 20% (by volume) ethanol. NPY-deficient mice were also less sensitive to the sedative/hypnotic effects of ethanol, as shown by more rapid recovery from ethanol-induced sleep, even though plasma ethanol concentrations did not differ significantly from those of controls. In contrast, transgenic mice that overexpressed a labeled NPY gene in neurons that usually express it had a lower preference for ethanol and were more sensitive to the sedative/hypnotic effects of ethanol than controls. These data provided direct evidence that alcohol consumption and resistance are inversely related to NPY levels in the brain. As part of an on-going study of the genetic basis of obesity, Karvonen et al. (1998) identified a 1128T-C polymorphism that resulted in substitution of leucine by proline at residue 7 in the signal peptide part of pre-pro-NPY. This polymorphism was not associated with obesity or energy metabolism, but was significantly and consistently associated with high serum total and LDL cholesterol levels both in normal-weight and obese Finns and in obese Dutch subjects. Uusitupa et al. (1998) found the pro7 polymorphism in 14% of Finns but in only 6% of Dutchmen. Subjects with pro7 in NPY had, on average, 0.6 to 1.4 mmol/L higher serum total cholesterol levels than those without this gene variant. As the impact of pro7 NPY on serum cholesterol levels could not be found in normal-weight Dutchmen, it can be assumed that obese persons may be more susceptible to the effect of the gene variant. It was calculated that the probability of having the pro7 in NPY could be as high as 50 to 60% in obese subjects with a total serum cholesterol equal to or higher than 8 mmol/L. At least among Finns, the pro7 form of NPY is one of the strongest genetic factors affecting serum cholesterol levels. SEE ALSO Allen and Bloom (1986) ; Dockray (1986) ; Maccarrone and Jarrott (1986) ; Minth et al. (1986)."

As indicated background teachings on NPY and it associated receptors have been prepared by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning NPYR1 has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY; 162640) is one of the most abundant neuropeptides in the mammalian nervous system and exhibits a diverse range of important physiologic activities, including effects on psychomotor activity, food intake, regulation of central endocrine secretion, and potent vasoactive effects on the cardiovascular system. Two major subtypes of NPY (Y1 and Y2) have been defined by pharmacologic criteria. The NPY Y1 receptors have been identified in a variety of tissues, including brain, spleen, small intestine, kidney, testis, placenta, and aortic smooth muscle. The Y2 receptor is found mainly in the central nervous system. Herzog et al. (1992) reported cloning of a cDNA encoding a human NPY receptor which they confirmed to be a member of the G protein-coupled receptor superfamily. When expressed in Chinese hamster ovary (CHO) or human embryonic kidney cells, the receptor exhibited characteristic ligand specificity. In the kidney cell line, the receptor was coupled to a pertussis toxin-sensitive G protein that mediated the inhibition of cyclic AMP accumulation. In the CHO cell line, on the other hand, the receptor was coupled not to inhibition of adenylate cyclase but rather to the elevation of intracellular calcium. Thus the second messenger coupling of the NPY receptor was cell type specific, depending on the specific repertoire of G proteins and effector systems present in the cell type. Larhammar et al. (1992) independently cloned and characterized the neuropeptide Y receptor. Herzog et al. (1993) determined the molecular organization and regulation of the human NPY Y1 receptor gene. In contrast to the contiguous structure of most G protein-coupled receptor genes, they found that the NPY Y1 receptor gene has 3 exons. They also identified a common PstI polymorphism in the first intron of the gene. By high resolution fluorescence in situ hybridization, they localized the gene to 4q31.3-q32. Herzog et al. (1997) found that the NPY1R and NPY5R (602001) genes are colocalized on chromosome 4q31-q32. The 2 genes are transcribed in opposite directions from a common promoter region. One of the alternately spliced 5-prime exons of the Y1 receptor gene is a part of the coding sequence of the Y5 receptor. This unusual arrangement suggested to Herzog et al. (1997) that the 2 genes arose by a gene duplication event and that they may be coordinately expressed. By interspecific backcross analysis, Lutz et al. (1997) mapped the Npy1r and Npy2r genes to conserved linkage groups on mouse chromosomes 8 and 3, respectively, which correspond to the distal region of human chromosome 4q."

As indicated background teachings on NPY and it associated receptors has been prepared by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning NPYR2 has been extracted from that source.

> "Neuropeptide Y (NPY) signals through a family of G protein-coupled receptors present in the brain and sympathetic neurons. At least 3 types of neuropeptide Y receptor have been defined on the basis of pharmacologic criteria, tissue distribution, and structure of the encoding gene; see 162641 and 162643. Rose et al. (1995) reported the expression cloning in COS cells of a cDNA for the human type 2 receptor, NPY2R. Transfected cells showed high affinity for NPY (162640), peptide YY (PYY; 600781), and a fragment of NPY including amino acids 13 to 36. The predicted 381-amino acid protein has 7 transmembrane domains characteristic of G protein-coupled receptors and is only 31% identical to the human Y1 receptor (NPY1R; 162641). A 4-kb mRNA was detected on Northern blots of tissue samples from several regions of the nervous system. Gerald et al. (1995) cloned the cDNA corresponding to the human Y2 receptor from a human hippocampal cDNA expression library using a radiolabeled PYY-binding assay. They expressed the Y2 gene in COS-7 cells and performed a hormone-binding assay which showed that the Y2 receptor binds (from highest to lowest affinity) PYY, NPY, and pancreatic polypeptide (PP; 167780) hormones. Ammar et al. (1996) cloned and characterized the human gene encoding the type 2 NPY receptor. The transcript spans 9 kb of genomic sequence and is encoded in 2 exons. As in the type 1 NPY receptor gene, the 5-prime untranslated region of NPY2R is interrupted by a 4.5-kb intervening sequence. Ammar et al. (1996) demonstrated by Southern analysis of rodent-human cell hybrids followed by fluorescence in situ hybridization (FISH) that the NPY2R gene maps to 4q31, the same region containing the NPY1R gene, suggesting that these subtypes may have arisen by gene duplication despite their structural differences. By interspecific backcross analysis, Lutz et al. (1997) mapped the Npy1r and Npy2r genes to conserved linkage groups on mouse chromosomes 8 and 3, respectively, which correspond to the distal region of human chromosome 4q."

An assay for determining whether a putative or actual agent according to the present invention can bind to NPY is presented in WO-A-98/52890 (see page 96 thereof, lines 2 to 28).

2065

I:NPY

As indicated above, the agent may be any suitable agent that can act as an I:NPY (sometimes referred to as an NPY antagonist).

Broad aspects of this aspect of the present invention therefore relate to:

a) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD (preferably FSAD); the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NPY.

b) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD (preferably FSAD); wherein said agent is an I:NPY.

c) A method of treating a female suffering from FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NPY.

d) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NPY.

e) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is an I:NPY.

f) A method of treating a female for FSD (preferably FSAD) or to prevent FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an I:NPY.

Other aspects of the present invention encompass:

A) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I:NPY.

B) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSAD, and wherein said agent is an I: NPY.

C) A method of treating a female suffering from FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I: NPY.

D) An assay method for identifying an agent that can be used to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: determining whether an agent can directly or indirectly potentiate cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD; and wherein said agent is an I: NPY.

E) A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is an I: NPY.

F) The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; and wherein said agent is an I: NPY.

G) A method of treating a female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the

266

female so as to cause enhanced genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; and wherein said agent is an I: NPY.

I:NPYs (in particular NPY antagonists) are discussed in the following review articles:

Dunlop J, Rosenzweig-Lipson S : Therapeutic approaches to obestity Exp Opin Ther Pat 1999 8 12 1683 -1694

Wang S, Ferguson KC, Burris TP, Dhurandhar NV: 8th annual international conference on obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus: novel drug developments. Exp Opin Invest Drugs 1999 8 7 1117 -1125

Ling AL : Neuropeptide Y receptor antagonists Exp Opin Ther Pat 1999 9 4 375-384

Adham N, Tamm J, Du P, Hou C, et al : Identification of residues involved in the binding of the antagonist SNAP 6608 to the Y5 receptor Soc Neurosci Abstr 1998 24 part 2 626.9

Shu YZ, Cutrone JQ, Klohr SE, Huang S : BMS-192548, a tetracyclic binding inhibitor of neuropeptide Y receptors, from Aspergillus niger WB2346. II. Physico-chemical properties and structural characterization J Antibiot 1995 48 10 1060-1065

Rigollier P, Rueger H, Whitebread S, Yamaguchi Y, Chiesi M, Schilling W, Criscione L : Synthesis and SAR of CGP 71683A, a potent and selective antagonist of the neuropeptide Y Y5 receptor. Int Symp Med Chem 1998 15th Edinburgh 239

Criscione L, Rigollier P, Batzl-Hartmann C, Rueger H, Stricker-Krongrad A, et al : Food intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. J Clin Invest 1998 102 12 2136 -2145

Neurogen Corp : NGD 95-1 Clin Trials Monitor 1996 5 10 Ab 19244

Buttle LA : Anti-obesity drugs: on target for huge market sales. Exp Opin Invest Drugs 1996 5 12 1583 -1587

Gehlert DR, Hipskind PA : Neuropeptide Y receptor antagonists in obesity. Exp Opin Invest Drugs 1996 7 9 1827 -1838

Goldstein DJ, Trautmann ME : Treatments for obesity. Emerging Drugs 1997 2 – 1-27

Hipskind P A, Lobb K L, Nixon J A, Britton T C, Bruns R F, Catlow J, Dieckman McGinty D K, Gackenheimer S L, Gitter B D, Iyengar S, Schober D A, et al. : Potent and selective 1,2,3-trisubstituted indole NPY Y-1 antagonists. J Med Chem 1997 40 3712 –3714

Zimmerman DM, Cantrall BE, Smith ECR, Nixon JA, Bruns RF, Gitter B, Hipskind PA, Ornstein PL, Zarrinmayeh H, Britton TC, Schober DA, Gehlert DR: Structure-

activity relationships of a series of 1-substituted-4-methylbenzimidazole neuropeptide Y-1 receptor antagonists Bioorganic Med Chem Lett 1998 8 5 473 –476

Zarrinmayeh H, Nunes A, Ornstein P, Zimmerman D, Arnold MB, et al : Synthesis and evaluation of a series of novel 2-[(4-chlorophenoxy)methy]benzimidazoles as selectiveneuropeptide Y Y1 receptor antagonists J Med Chem 1998 41 15 2709 – 2719

Britton TC, Spinazze PG, Hipskind PA, Zimmerman DM, Zarrinmayeh H, Schober DA, Gehlert DR, Bruns RF : Structure-activity relationships of a series of benzothiophene-dervied NPY-Y1 antagonists: optimization of the C2 side chain Bioorganic Med Chem Lett 1999 9 3 475 -480

Zarrinmayeh H, Zimmerman DM, Cantrell BE, Schober DA, Bruns RF, Gackenheimer SL, Ornstein PL, Hipskind PA, Britton TC, Gehlert DR : Structure-activity relationship of a series of diaminoalkyl substituted benzimidazole as neuropeptide Y Y1 receptor antagonists Bioorganic Med Chem Lett 1999 9 5 647 -652

Murakami Y, Hara H, Okada T, Hashizume H, Kii M, Ishihara Y, Ishikawa M, Mihara S-I, Kato G, Hanasaki K, Hagishita S, Fujimoto M : 1,3-disubstituted benzazepines as novel, potent, selective neurpeptide Y Y1 receptor antagonists J Med Chem 1999 42 14 2621-2632

Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Beck Sickinger AG, Doods HN : The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur J Pharmacol 1994 271 2-3 R11 -R13

Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Doods HN : Subtype selectivity and antagonbist profile of the nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226 J Pharmacol Exp Ther 1995 275 1 143 –149.

Wright J, Bolton G, Creswell M, Downing D, Georgic L, Heffner T, Hodges J, MacKenzie R, Wise L : 8-amino-6-(arylsulphonyl)-5-nitroquinolones: novel nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonists Bioorganic Med Chem Lett 1996 6 15 1809 -1814

Capurro D, Huidobro-Toro JP : The involvement of neyropeptide Y Y1 receptors in the blood pressure baroreflex:studies with BIBP 3226 and BIB 3304. Eur J Pharmacol 1999 376 3 251 –255

Dumont Y, Cadieux A, Doods H, Quirion R : New tools to investigate neuropeptide Y receptors in the central and peripheral nervous systems: BIBO-3304 (Y1), BIIE-246 (Y2) and [125I]-GR-231118 (Y1/Y4). Soc Neurosci Abstr 1999 25 Part 1 Abs 74.11

2067

Hegde SS, Bonhaus DW, Stanley W, Eglen RM, Moy TM, Loeb M, et al : Pharmacological evaluation of 1229U91, a high affinity and selective neuropeptide Y(NPY) - Y1 receptor antagonist Pharmacol Res 1995 31 190

Matthews JE, Chance WT, Grizzle MK, Heyer D, Daniels AJ : Food intake inhibition and body weight loss in rats treated with GI 264879A, an NPY-Y1 receptor. Soc Neurosci Abstr 1997 23 Pt 2 1346

Doods HN, Willim K-D, Smith SJ : BIBP 3226: a selective and highly potent NPY-Y1 antagonist Proc Br Pharmacol Soc 1994 13-16 Dec. C47

Rudolf K, Eberlein W, Engel W, Wieland HA, Willim KD, Entzeroth M, Wienen W, Beck Sickinger AG, Doods HN : The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur J Pharmacol 1994 271 2-3 R11 -R13

Serradelil-Le-Gal C, Valette G, Rouby PE, Pellet A, Villanova G, Foulon L, Lespy L, Neliat G, Chambon JP, Maffrand JP, Le-Fur G : SR 120107A and SR 120819A: Two potent and selective, orally-effective antagonists for NPY Y1 receptors Soc Neurosci Abstr 1994 20 Pt 1 907 -Abs 376.14

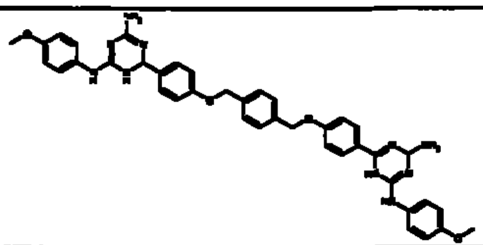
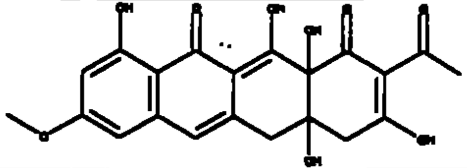
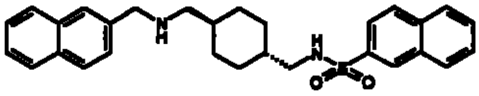
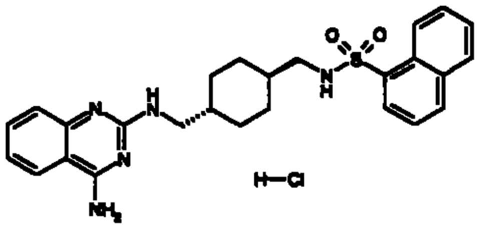
Hong Y, Gregor V, Ling AL, Tompkins EV, Porter J, Chou TS, Paderes G, Peng Z, Hagaman C, Anderes K, Luthin D, May J : Synthesis and biological evaluation of novel guanylurea compounds as potent NPY Y1 receptor antagonist Acs 1999 217 Anaheim MEDI 108

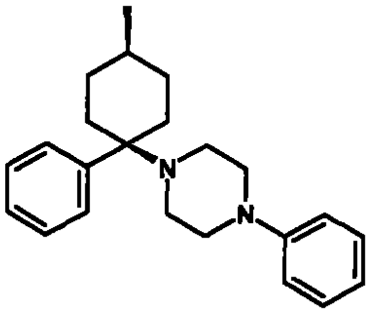
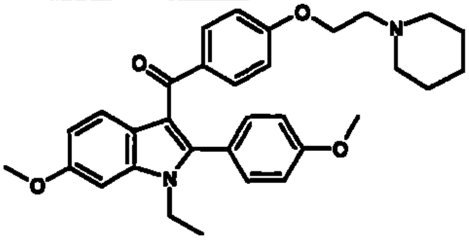
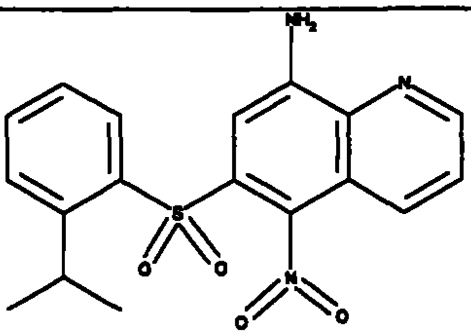
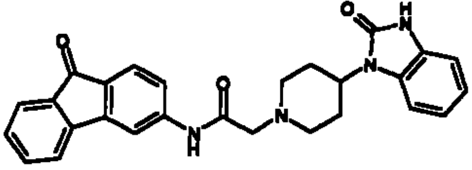
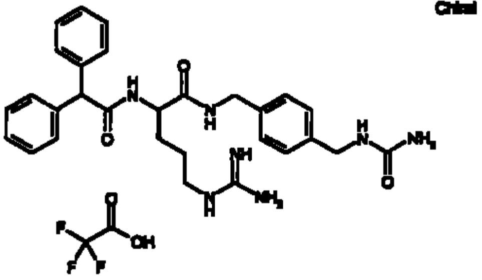
I:NPYs (in particular NPY antagonists) are disclosed in the following documents:

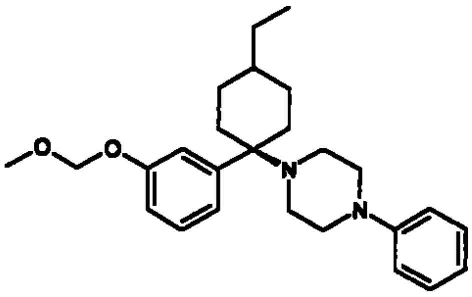
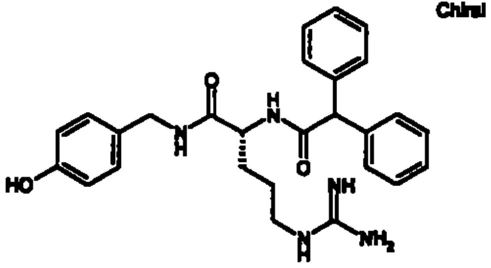
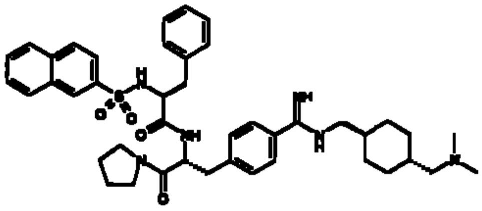
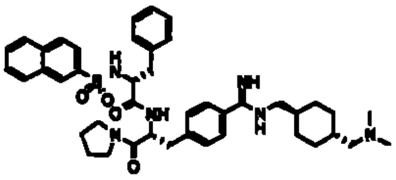
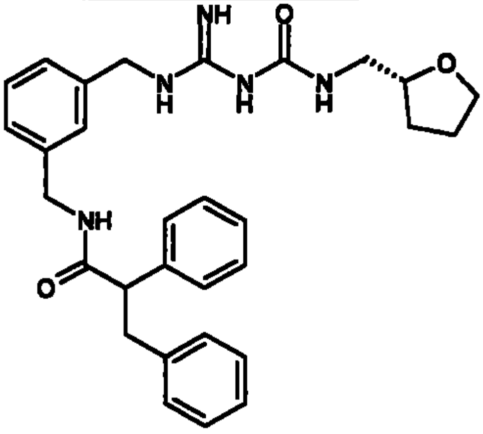
WO-98/07420
WO-94/00486
WO-96/22305
WO-97/20821
WO-97/20822
WO-96/14307
JP-07267988
WO-96/12489
US-5552422
WO-98/35957
WO-96/14307
WO-94/17035
EP-0614911

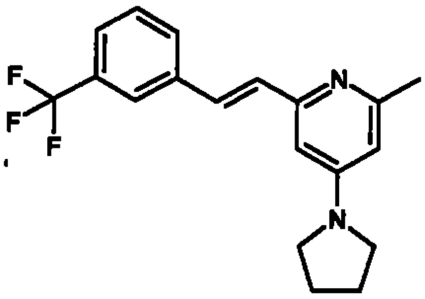
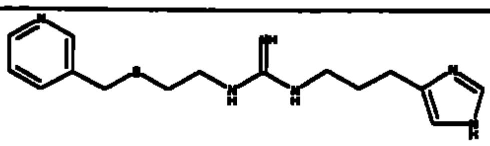
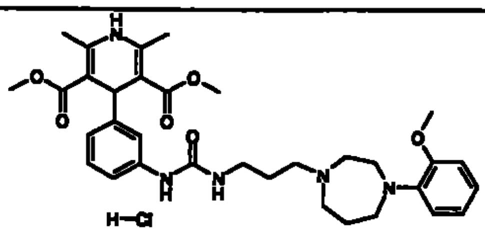
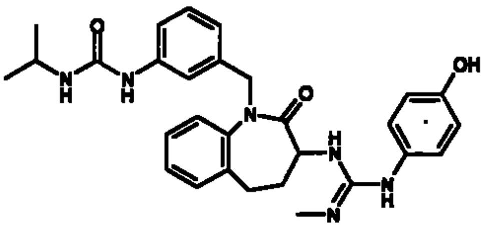
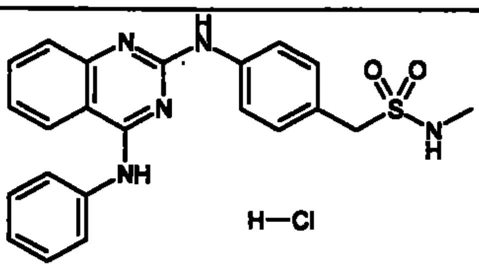
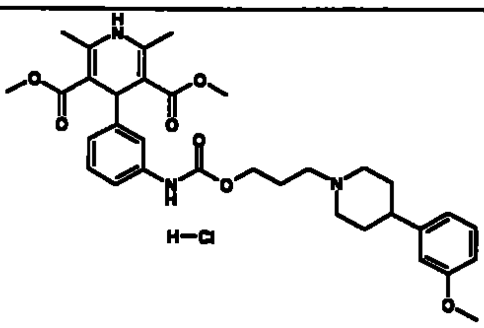
WO-98/40356
EP-0448765
EP-0747356
WO-98/35941
WO-97/46250
EP-0747357

Preferred examples of I:NPYs are selected from the following structures. These compounds were tested as agents according to the present invention and were found to be useful in potentiating cAMP, and thereby being useful in the treatment of FSAD. Some of the experimental data concerning these compounds are presented in the Experimental section (*infra*).

| **Compound** | **Structure** | **Mode of Action**<br>**References** |
|---|---|---|
| | | |
| F34 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/07420<br>Ref 3 |
| F35 |  | I:NPY<br>Ref 5 |
| F36 |  | I:NPY Y5<br>Ref 1, 4 |
| F37 | Ile - Cys- Pro- Cys- Tyr- Arg- Leu- Arg- Tyr- NH2 cyclic (2,2'), (4,4')- disulfide dimer | I:NPY Y1<br>WO-94/00486<br>WO-96/22305<br>Ref 1,2, 23 |
| F38 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/20821<br>WO-97/20822<br>Ref 1, 3, 6, 7 |

| | | |
|---|---|---|
| F39 |  | I:NYP Y1<br>WO-96/14307<br>Ref 1, 8, 9, 10, 11 |
| F40 | For formula; see reference | I:NPY Y1<br>JP-07267988<br>Ref 1 |
| F41 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/12489<br>Ref 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |
| F42 |  | I:NPY Y1<br>US-5552422<br>Ref 17, 18, 19, 20 |
| F43 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/35957<br>Ref 3 |
| F44 |  | I:NPY Y1<br>Ref 21, 22 |

| | | |
|---|---|---|
| F45 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref 3 |
| F46 | For formula, see reference | I:NPY Y1<br>Ref 24 |
| F47 |  | I:NPY Y1<br>WO-94/17035<br>Ref 3, 17, 25, 26 |
| F47 | For formula, see reference | I:NPY Y1<br>Ref 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |
| F48 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27 |
| F49 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27 |
| F50 |  | I:NPY Y1<br>Ref 28 |

| | | |
|---|---|---|
| F51 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/40356 |
| F52 |  | I:NPY<br>EP-0448765 |
| F53 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747356 |
| F54 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/35941 |
| F55 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/46250 |
| F56 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747357 |

VIP (vasoactive intestinal peptide)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is VIP or one of its associated receptors. Current classification/nomenclature refers to these as VPAC1, VPAC2 and PACAP.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for VIP and its receptors are available in the literature. Some sequences are presented in the Sequence Listings provided herein.

We have shown that VPAC1and VPAC2 are present in human and rabbit vagina. PACAP was absent from both rabbit and human vagina.

VIP is the major endogenous neurotransmitter released during sexual arousal that is responsible for nerve-induced vaginal vasodilation of the vascular beds located in the vaginal wall. These vasodilatory effects are mediated by adenylate cyclase activation and cAMP production. Without wishing to be bound by theory, this effect may be mediated via VIP receptor subtypes $VPAC_1$, $VPAC_2$ or PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) receptors. $VPAC_2$ and PACAP receptors are not expressed outside of the CNS and the receptors despite being expressed in the pituitary, appears to have no widespread biological function.

The agent of the present invention could potentiate VIP and/or act as a VIP mimetic or analogue thereof. The agent would then potentiate and/or mimic the vasorelaxant effects of endogenous VIP released during sexual arousal. The agent may also have an additive effect on VIP-induced relaxations of vaginal smooth muscle. Clinically this will lead to FSAD treatment, though increased vaginal lubrication *via* vaginal wall engorgement and compliance. In this embodiment, the mimetic or analogue would not have, however, the adverse properties of VIP as discussed *supra*.

Background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning VIP has been extracted from that source.

2070

"Vasoactive intestinal peptide (VIP), a 28-amino acid peptide originally isolated from porcine duodenum, is present not only in gastrointestinal tissues but also in neural tissues, possibly as a neurotransmitter, and exhibits a wide variety of biological actions. Because VIP shows similarities to glucagon, secretin and gastric inhibitory peptide (GIP), it has been considered a member of the glucagon-secretin family. The primary translation product of the mRNA encoding VIP (prepro-VIP) has a molecular weight of 20 daltons. By cloning the DNA sequence complementary to the mRNA coding for human VIP, Itoh et al. (1983) found that the VIP precursor contains not only VIP but also a novel peptide of 27 amino acids, designated PHM27, that has aminoterminal histidine and carboxyterminal methionine. It differs from PHI17 isolated from porcine intestine by 2 amino acids; PHI27, as its designation indicates, has carboxyterminal isoleucine. Linder et al. (1987) isolated the human gene for VIP and PHM27 and studied its expression in various tissues of the rat. Heinz-Erian et al. (1985) suggested that deficient innovation of sweat glands of cystic fibrosis patients by the VIP neuropeptide might be a basic mechanism for the decreased water content and relative impermeability of the epithelium to chloride and other ions that characterize cystic fibrosis. To test this hypothesis, Gozes et al. (1987) took the 'candidate gene' approach. Bodner et al. (1985) had shown that VIP and PHM-27 are encoded by adjacent exons. Gozes et al. (1987) used the PHM-27-encoding genomic fragment to detect the presence of the VIP gene at 6q21-qter. Thus, they eliminated a defective VIP gene as a candidate for the primary cause of cystic fibrosis (which is coded by chromosome 7). By in situ hybridization techniques, Gozes et al. (1987) assigned the VIP gene to 6q24. This placed VIP in the region of MYB (189990), which has been mapped to 6q22. Gozes et al. (1987) investigated a functional relationship between the 2 genes in neuronal tissue. They observed a sharp peak of MYB mRNA in the hippocampus of 3-day-old rats, preceding the peak of VIP mRNA that occurs in this area at 8 days of age. Omary and Kagnoff (1987) found nuclear receptors for VIP in a human colonic adenocarcinoma cell line. Gotoh et al. (1988) assigned VIP to chromosome 6 by spot blot hybridization of a molecularly cloned fragment of the gene to sorted chromosomes. The localization was refined to 6q26-q27 by in situ hybridization."

As indicated, background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning VIPR1 or VPAC1 has been extracted from that source.

"Vasoactive intestinal peptide (VIP; 192320) is an octacosameric neuroendocrine mediator found predominantly in cholinergic presynaptic neurons of the central nervous system and in peripheral peptidergic neurons innervating diverse tissues. Of the many neuroendocrine peptides with immunologic functions, VIP is distinguished by its capacity to affect both B and T cells directly. Distinct subsets of neural, respiratory, gastrointestinal, and immune cells bear specific high-affinity receptors for VIP, which are associated with a guanine nucleotide-binding (G) protein capable of activating adenylate cyclase. Libert et al. (1991) obtained 4 new receptors of the G protein-coupled receptor family by selective amplification and cloning from thyroid cDNA. One of these, termed RDC1, was identified as the VIP receptor by Sreedharan et al. (1991). Libert et al. (1991) mapped the VIPR gene to 2q37 by in situ hybridization. Later information made it doubtful that the gene mapped to 2q37 was in fact the VIP receptor gene (Vassart, 1992). The sequence that was designated GPRN1 by Sreedharan et al. (1991) and mapped to 2q37 was found not to bind VIP by Wenger (1993). Sreedharan et al. (1995) isolated an authentic type I VIP receptor gene and by fluorescence in situ hybridization localized it to the 3p22 band in a region associated with small-cell lung cancer. By interspecific backcross analysis, Hashimoto et al. (1999) mapped the mouse Vipr1 gene to the distal region of chromosome 9, a region that shows homology of synteny with human chromosome 3p. Sreedharan et al. (1993) cloned a human intestinal VIP receptor gene; the deduced amino acid sequence shares 84% identity with the rat lung VIP receptor. Couvineau et al. (1994) isolated 2 VIPR cDNA clones from a human jejunal epithelial cell cDNA library. One encodes a VIP receptor consisting of 460 amino acids and having 7 putative transmembrane domains, as do other G protein-coupled receptors. The other encodes a 495-amino acid VIP receptor-related protein exhibiting 100% homology with the functional VIP receptor over the 428 amino acids at the C-terminal region, but containing a completely divergent 67-amino acid N-terminal domain. When expressed in COS-7 cells, the second protein did not bind radioiodinated VIP, although it was normally addressed at the plasma membrane as assessed by immunofluorescence studies. The type I VIP receptor, also termed type II PACAP receptor (see 102981 for another type of PACAP receptor), was found by Sreedharan et al. (1995) to span approximately 22 kb and to be comprised of 13 exons (ranging from 42 to 1,400 bp) and 12 introns (ranging from 0.3 to 6.1 kb). Sreedharan et al. (1995) also characterized the promoter and the 5-prime flanking region of the gene."

As indicated, background teachings on VIP and it associated receptors are presented by Victor A. McKusick et al (ibid). The following text concerning VIPR2 or VPAC2 has been extracted from that source.

> "Vasoactive intestinal peptide (VIP; 192320) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP; 102980) are homologous peptides that function as neurotransmitters and neuroendocrine hormones. While the receptors for VIP and PACAP share homology, they differ in their substrate specificities and expression patterns. See VIPR1 (192321) and ADCYAP1R1(102981). Svoboda et al. (1994) performed low stringency PCR using primers based on sequences conserved among VIP receptors. They cloned the human VIP2 receptor gene from a lymphoblast cDNA library. This gene encoded a 438-amino acid polypeptide that shares 86% identity with the rat VIP2 receptor. They expressed the human VIP2 receptor in Chinese hamster ovary cells and found that it binds to PACAP-38, PACAP-27, VIP, and helodermin, and that binding of the receptor to any of these peptides activates adenylate cyclase. Peptide binding was found to be inhibited by GTP. Adamou et al. (1995) cloned the VIP2 receptor gene from a human placenta cDNA library. Northern blotting revealed that VIPR2 is expressed as 2 transcripts of 4.6 kb and 2.3 kb at high levels in skeletal muscle and at lower levels in heart, brain, placenta, and pancreas. Mackay et al. (1996) used fluorescence in situ hybridization to map the VIPR2 gene to human chromosome 7q36.3. Further mapping with cell lines derived from patients with holoprosencephaly type 3 (HPE3; 142945) revealed that the VIPR2 gene lies within the HPE3 minimal critical region. Mackay et al. (1996) stated that although VIPR2 may contribute to the HPE3 phenotype, it is not the sole factor responsible."

## AC (adenylate cyclase)

According to one aspect of the present invention, a $P_{cAMP}$ target is AC.

Nucleotide sequences and amino acid sequences for AC are available in the literature.

To confirm that VIP induces vasorelaxation via elevation of intracellular cAMP levels and consequent activation of adenylate cyclase we have measured vaginal cAMP concentrations during VIP stimulation and used forskolin, an adenylate cyclase activator, to mimic the effects of activating the cAMP/adenylate cyclase pathway.

In these studies, we found that VIP treatment and forskolin treatment elevate intracellular concentrations cAMP in isolated vaginal tissue.

We also found that forskolin increases vaginal blood flow in an animal model of sexual arousal.

Additionally we found that forskolin induces relaxation in isolated vagina.

Background teachings on AC are presented by Victor A. McKusick et al on http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. The following text concerning AC has been extracted from that source.

> "Adenylyl cyclase (EC 4.6.1.1 ) catalyzes the transformation of ATP into cyclic AMP. The enzymatic activity is under the control of several hormones, and different polypeptides participate in the transduction of the signal from the receptor to the catalytic moiety. Stimulatory or inhibitory receptors (Rs and Ri) interact with G proteins (Gs and Gi) that exhibit GTPase activity and they modulate the activity of the catalytic subunit of the adenylyl cyclase. Parma et al. (1991) cloned a cDNA corresponding to human brain adenylyl cyclase, symbolized by them as HBAC1. By in situ hybridization to metaphase chromosomal spreads using the human brain cDNA probe, Stengel et al. (1992) showed that the gene is located on 8q24.2. A highly homologous gene, ADCY2 (103071), was assigned to 5p15.3 by the same method."

## GENERAL RECOMBINANT DNA METHODOLOGY TECHNIQUES

Although in general the techniques mentioned herein are well known in the art, reference may be made in particular to Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) and Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. PCR is described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188.

2072

## SUMMARY

In summation, the present invention relates to:

1. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

2. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, in particular FSAD.

3. A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

4. An assay method for identifying an agent that can be used to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: determining whether an agent can directly or indirectly potentiate cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In other embodiments, the present invention relates to:

5. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, in particular FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; wherein the agent is selected from any one or more of:

a cAMP mimetic
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

6. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD, in particular FSAD; wherein the agent is capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; wherein the agent is selected from any one or more of:

a cAMP mimetic
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$.

3073

7. A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD, wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient, wherein the agent is selected from any one or more of:

a cAMP mimetic
I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$
P$_{cAMP}$.

8. An assay method for identifying an agent that treat a female suffering from FSD, in particular FSAD, the assay method comprising determining whether or not a putative agent is capable of acting as any one or more of:
a cAMP mimetic
I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_n$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$
P$_{cAMP}$

wherein if the putative agent is capable of acting as any one or more of

a cAMP mimetic
I:$PDE_{cAMP}$
I:$PDEn_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY $Y_n$
I:NEP
U:$A_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:$VIP_n$
I:I:VIPr
I:I:$VIP_n$
$P_{cAMP}$

then the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

In other embodiments, the present invention relates to:

9. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

10. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; wherein the agent is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of a female.

11. A method of treating a female; the method comprising delivering to the female an agent that is capable of enhancing cAMP signalling in the sexual genitalia of the female so as to cause enhanced genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow.

## EXAMPLES

The present invention will now be described, by way of example only, in which reference is made to the following Figures:

Figure 1 which is a graph;
Figure 2 which is a graph;
Figure 3 which is a graph;
Figure 4 which is a graph;
Figure 5 which is a graph;
Figure 6 which is a graph;
Figure 7 which is a graph;
Figure 8 which is a graph;
Figure 9 which is a graph;
Figure 10 which is a graph;
Figure 11 which is a graph; and
Figure 12 which is a graph.

In more detail:

Figure 1:- Electrical stimulation of the pelvic nerve induces a frequency-dependent increase in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Increasing the stimulation frequency induces larger increases in blood flow. Changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 2:- Vasoactive intestinal peptide (VIP)-induces increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Figure 2a illustrates how vaginal blood flow is increased in a concentration dependent manner by infusions of VIP (intravenous bolus). Figure 2b demonstrates that 2 repetitive infusions of VIP produce similar increases in blood flow. Note the duration of the response is also similar. All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 3:- Vasoactive intestinal peptide (VIP) reduces the mean arterial blood pressure in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. This graph illustrates the *typical* effects of the vasoactive agents and stimulation parameters used to investigate vagina blood flow on mean arterial pressure in an anaesthetised rabbit. These observed effects are typical of the trends seen in all animals tested. VIP

induced a significant depression of mean arterial pressure whereas pelvic nerve stimulation, control infusions of Hepsaline or inhibitors of $PDE_{cAMP}$ or NEP have no effect on blood pressure. Note, the reduction in blood pressure associated with VIP infusions is also associated with a large increase in heart rate.

Figure 4:- Activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway mimics VIP mediated vasorelaxation and smooth muscle relaxation in vaginal tissue. Figure 4a illustrates that an infusion of forskolin (40nmol/kg *iv* bolus, a cAMPmimetic) induces significant increases in vaginal blood flow. Note the amplitude and duration of the response is similar to that induced by VIP (20.0µg/kg, *iv* bolus). Interestingly, the effects on blood flow have a longer duration of action on the external vaginal wall. All changes were monitored using laser Doppler technologies. Figure 4b demonstrates that both VIP (0.1µM) and forskolin (10µM) significantly elevate intracellular concentrations of cAMP above basal levels in the rabbit vagina. Figure 4c shows that forskolin induces potent relaxations of precontracted (1µM phenylephrine) rabbit vaginal strips with an $IC_{50}$~300nM. All changes were quantified using *in vivo* laser Doppler technologies, biochemical cAMP enzyme immunoassay or by *in vitro* tissue relaxation.

Figure 5:- Infusion of VIP increases clitoral blood flow and activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway mimics VIP mediated clitoral vasorelaxation in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Infusion of VIP (60-200µg/kg) induces a concentration dependant increase in clitoral blood flow. A 115% increase in clitoral blood flow was observed after an iv infusion of 200µg/kg VIP. The effects of VIP on clitoral blood flow can be mimicked by an infusion of a cAMP mimetic forskolin (FSK, 40nmol/kg *iv* bolus). A 156% increase in clitoral blood flow was observed after an iv infusion of 40nmol/kg forskolin. All increases were significantly elevated from control infusions (Hepsaline). Note the amplitude of the response is similar to that induced by VIP (200µg/kg, *iv* bolus) and comparable to those observed on vaginal blood flow in Figs 2 and 4. All changes were quantified using *in vivo* laser Doppler technologies and were significantly increased when compared to vehicle infusions (Hepsaline).

Figure 6:- A selective inhibitor of NEP EC 3.4.24.11 enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive PNS at 15 minute intervals induces reproducible increases in vaginal blood flow (White bar). Administration of a NEP inhibitor (Grey bar) enhanced the peak increase in vaginal blood flow induced by submaximal

2075

stimulation frequencies (eg 4Hz) compared to increases observed during time matched control stimulations or vehicle controls (Hatched bar). The following dose dependant enhancements were observed - 0.3mg/kg iv induced a 40% increase and 1.0mg/kg iv induced a 91% increase (mean n=3). The NEP inhibitor had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow (Data not shown). All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 7:- Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive infusions of VIP at 30 minute intervals induce reproducible increases in vaginal blood flow (See figure 2b). An NEP inhibitor both potentiates the amplitude and prolongs the duration of enhanced blood flow when these increases are induced by submaximal doses of VIP e.g. 6.0μg/kg. At doses of VIP which induce maximal increases in vaginal blood flow eg 60μg/kg, NEP inhibitors only potentiate the duration of enhanced vaginal blood flow. VIP-induced increase in the presence of a NEP inhibitor are shown as closed triangles whereas control VIP responses are shown as open triangles. A control infusion of Hepsaline has no effect on the amplitude of the responses. All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 8:- A selective inhibitor of $PDE_{cAMP}$ type 2 enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive PNS at 15 minute intervals induces reproducible increases in vaginal blood flow (White squares). Administration of a $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor enhanced the peak increase in vaginal blood flow induced by submaximal stimulation frequencies (Black squares; at 4Hz) compared to increases observed during time matched control stimulations (Open squares). An infusion of the PDE2 inhibitor (500μg/kg) induced a 86.8±21.9% enhancement in vaginal blood flow (mean±sem n=2). All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 9:- Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ type 2 enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive infusions of VIP at 30 minute intervals induce reproducible increases in vaginal blood flow (See figure 2b). A selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor (25μg/kg *iv* bolus) potentiates the duration of enhanced vaginal blood flow induced by VIP (60μg/kg *iv* bolus). VIP-induced increases in the presence of a $PDE_{cAMP}$ inhibitor are shown as

closed triangles whereas control VIP responses are shown as open triangles. A control infusion of Hepsaline had no effect on the amplitude of the responses. All changes were monitored using Laser Doppler technologies.

Figure 10:- A selective antagonist of NPY Y1 receptors enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in vaginal blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Repetitive PNS at 15 minute intervals induces reproducible increases in vaginal blood flow (data not shown). Administration of a NPY Y1 antagonist (Grey bar) enhanced the peak increase in vaginal blood flow induced by submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz) compared to increases observed during time matched control stimulations or in vehicle controls (Hatched bar). The following dose dependant enhancements were observed - 0.01mg/kg iv induced a 15.8±19.6% increase; 0.03mg/kg iv induced a 35.1±17.17% increase; 0.10mg/kg iv induced a 60.1±16.9% increase and 0.3mg/kg iv induced a 91.9±27.4% increase (mean±sem n=3). The NPY Y1 antagonist had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow (Data not shown). All changes were monitored using laser Doppler technologies.

Figure 11 provides a summary graph for some of the data provided herein showing that the agents of the present invention are very useful in increasing vaginal blood flow by potentiating endogenous cAMP levels.

Figure 12:- A selective inhibitor of NEP EC 3.4.24.11 enhances pelvic nerve stimulated (PNS) increases in clitoral blood flow in the anaesthetised rabbit model of sexual arousal. Administration of a NEP inhibitor (Grey bar) enhanced the peak increase in clitoral blood flow induced by submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz) compared to increases observed during time matched control stimulations or vehicle controls (Hatched bar). The following dose dependant enhancements were observed – 1.0mg/kg iv induced a 131% increase (mean n=3). The NEP inhibitor had no effect on basal (unstimulated) clitoral blood flow. All changes were monitored using laser Doppler technologies.

2076

AN ASSAY FOR MEASURING cAMP ACTIVITY/LEVELS

Measurement of cAMP from vaginal tissue samples using a Biotrak cAMP Enzymeimmunoassay (EIA) kit (Amersham Life Sciences RPN 225).

cAMP levels are measured by EIA in vaginal tissue samples. The EIA is based on competition between unlabelled cAMP and a fixed quantity of peroxidase labelled cAMP for a limited amount of cAMP specific antibody.

## 1. MATERIALS

All materials are supplied by Amersham Life Science cAMP EIA kit (RPN 225) unless otherwise stated.

1.1 Microtitre plate - 96 well plate coated with donkey anti-rabbit IgG.

1.2 Assay buffer - 0.05M sodium acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. The contents of the bottle are transferred to a graduated cylinder using 3x15ml distilled water washes. The final volume is then adjusted to 500ml.

1.3 cAMP standard (for acetylation method). cAMP at 10.24pmol/ml in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Standard is dissolved in 2.5ml of assay buffer for use.

1.4 Antiserum. Anti-cAMP antibody in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Prior to use, antibody is diluted with 11ml assay buffer and mixed by gentle inversion to dissolve contents.

1.5 cAMP conjugate. cAMP horseradish peroxidase in 0.05M acetate buffer pH5.8 containing 0.02% bovine serum albumin and 0.5% preservative upon reconstitution. Prior to use, solution is diluted with 11ml assay buffer and mixed by gentle inversion to dissolve contents.

1.6 Wash buffer. 0.01M phosphate buffer pH7.5 containing 0.05% (v/v) Tween™ 20 upon reconstitution. The contents of the bottle are transferred to a graduated cylinder using 3x15ml distilled water washes. The final volume is then adjusted to 500ml.

1.7 TMB substrate. 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine (TMB)/ hydrogen peroxide, in 20% (v/v) dimethylformamide.

Ready for use.

1.8 Acetylation reagent. 2ml acetic anhydride, 4ml triethylamine, prepared as required.

1.9 Sulphuric acid (1M). 1M Sulphuric acid is prepared from an 18M stock (BDH). 1.11ml of acid is added to 18.8ml of distilled water.

## 2. SPECIFIC EQUIPMENT

2.1 Disposable 5ml glass test tubes

2.2 Spectrophotometric plate reader (Spectra max 190)

2.3 Microtitre plate shaker (Luckham R100)

## 3. METHODS

- Tissue sample preparation. The tissues were treated with the relevant pretreatment in 5ml samples of physiological salt solution eg agonists, cAMPmimetics etc. After treatment the samples were snap frozen in liquid nitrogen and then smashed using a hammer. The powder was scraped into a centrifuge tube and 1ml of 0.5M ice cold perchloric acid (PCA) was added. The sample was vortex mixed and left on ice for 1hr.
- cAMP extraction from tissue samples. The samples were centrifuged at 10000g for 5 min at 4°C. The supernatant was removed and placed in other centrifuge tubes. The pellet was keep for protein analysis at -80°C. The supernatant samples were then neutralised to pH~6 using $K_3PO_4$. Centrifuged at 10000g for 5 min at 4°C. Recover supernatant and wash 4 times with 5 volumes (5ml) of water saturated diethyl ether. The upper ether layer should be discarded after each wash. Transfer aqueous to into a short thin glass tube and dry under a steam of nitrogen at 60°C. Dissolve dried extract in 1ml of assay buffer and store in refrigerator until required (or can be frozen).
- Stock reagents are equilibrated to room temperature and working solutions then prepared
- cAMP standards are prepared in glass tubes labelled 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, and 512fmol. This is achieved by adding 1ml of assay buffer to all tubes except the 512fmol standard. 1ml of acetylation standard (10.24pmol/ml) is then added to

the two top standards (256, and 512fmol). The 256fmol standard is vortexed and 1ml transferred to the 128fmol standard. his is continued until the 2fmol standard where 1ml of solution is disposed of. A zero standard tube is set up containing 1ml of assay buffer.

- Tissue extract samples are thawed on ice (if necessary) and diluted 1 in 100 (10µl sample to 990µl assay buffer) in labelled glass tubes.
- The cAMP in all standards and samples is acetylated by the addition of 100µl of acetylation reagent in a fume hood which is added down the side of the tube before immediately vortexing.
- 50µl of all standards and samples are added to the appropriate wells of the 96 well plate, and 150µl of assay buffer is added to non specific binding (NSB) wells.
- 100µl of antiserum is added to all wells except blanks (B) and NSB before incubating for 2 hours at 3-5°C.
- After incubation, 100µl of cAMP-peroxidase conjugate is added to all wells except B before a further 1 hour incubation at 3-5°C.
- Plates are emptied by turning them upside down and blotting onto absorbent paper before washing each well four times with 400µl of wash buffer. After each wash plates are re-blotted to ensure any residual wash buffer is removed. 200µl TMB is then immediately dispensed into all wells.
- Plates are put on a plate shaker for 30 minutes at room temperature before the addition of 100µl of 1M sulphuric acid into all wells. The optical density is read on Spectra max 190 at 450nm within 30 minutes.

## 4. STANDARDS

With each assay the following standard tubes are set up:-

### 4.1 Spiking a standard in assay buffer

A known amount of cAMP is spiked into assay buffer to determine the efficiency of the assay. 70pmol/ml of cAMP is added to assay buffer which is equivalent to 35fmol/well in the assay, which is in the middle of the dose response curve.

To make up 1ml of standard:- 68.4µl 521fmol/well standard
931.6µl Assay buffer

4. Effects of compounds on plate

Standards are set up to determine whether the compound used in the functionalstudies has any effect on the 96 well plate or affects the binding of cAMP. These include:-

- Spiking the compound into assay buffer alone to assess the effects of the compound directly on the plate.
- Spiking the compound into plasma containing basal levels of cAMP to assess the effects of the compound on the binding of cAMP to the plate.

5nM concentrations of compound are spiked into each standard. 5nM is chosen because total drug levels at the end of infusion have in the past been approximately 150-300nM. Samples are diluted 1:100 before being assayed, therefore 5nM allows for any larger than expected total drug concentrations at the end of infusion.

5. CALCULATIONS

The Spectra max plate reader reads the optical density (OD) at 450nm.

The standard curve is generated by plotting the %B/Bo (y axis) against cAMP fmol/well (x axis) on Spectra max.

%B/B0 (% bound) for each sample and standard is calculated as follows:-
Bo = zero standard (see methods 3.2)

$$\%B/Bo = \frac{(\text{standard or sample OD-NSB OD})}{(\text{Bo OD-NSB OD})} \times 100$$

The fmol/well volume can then be read directly from the standard curve for each sample. Values are then converted to pmol/ml before taking the mean of each pair of samples.

Conversion of values from fmol/well to pmol/ml:-

fmol to pmol = divide by 1000
Volume in well = 50µl .... So (x1000)
50
Sample is diluted 1/100, so overall = 1 x 1000/1000 x 100/50 = 2

So all fmol/well values are multiplied by 2 to give pmol/ml

## ANIMAL TEST MODEL

## POTENTIATING THE EFFECTS OF CYCLIC ADENOSINE-3',5'-MONOPHOSPHATE (cAMP) RESULTS IN INCREASES IN VAGINAL BLOOD FLOW IN THE ANAESTHETISED RABBIT MODEL OF SEXUAL AROUSAL

### 1.0 Aims

1. To develop and validate an animal model of female sexual arousal.
2. To identify the mechanism(s) responsible for the regulation of genital blood flow in the anaesthetised rabbit.
3. To identify potential approaches for enhancement of vaginal and clitoral blood flow.
4. To investigate the mechanism(s) that underlie relaxation of vaginal smooth muscle and to identify potential approaches for enhancement of vaginal relaxation.

### 2.0 Introduction

The normal sexual arousal response consists of a number of physiological responses that are observed during sexual excitement. These changes such as vaginal, labial and clitoral engorgement result from increases in genital blood flow. Engorgement leads to increased vaginal lubrication via plasma transudation, increased vaginal compliance (relaxation of vaginal smooth muscle) and increases in vaginal and clitoral sensitivity.

Female sexual arousal disorder (FSAD) is a highly prevalent sexual disorder affecting up to 40% of pre-, peri- and postmenopausal (±HRT) women. The primary consequence of FSAD is reduced genital engorgement or swelling which manifests itself as a lack of vaginal lubrication and a lack of pleasurable genital sensation. Secondary consequences include reduced sexual desire, pain during intercourse and difficulty in achieving orgasm. The most common cause of FSAD is decreased genital blood flow resulting in reduced vaginal, labial and clitoral engorgement. (Park, 1997; Goldstein, 1998; Berman, 1999a, Werbin, 1999).

As explained herein, the present invention provides a means for restoring or potentiating the normal sexual arousal response in women suffering from FSAD, by enhancing genital blood flow.

In our studies, we have identified cAMP (cyclic adenosine-3',5'-monophosphate) as the mediator of vaginal vasorelaxation using laser Doppler technology to measure small changes in genital blood flow. Using an inhibitor of VIP metabilism (a NEP EC3.4.24.11 inhibitor), we have also demonstrated that the increases in genital blood flow observed during pelvic nerve stimulation (ie sexual arousal) are mediated by VIP. This has involved developing an animal model of sexual arousal and demonstrating that the data reflects the physiological changes observed during female sexual arousal. The model has then been used to identify and validate mechanisms that enhance genital blood flow eg. direct or indirect potentiation of cAMP-mediated vasorelaxation.

## 3.0 Methods

### *3.1 Anaesthetic Protocol*

Female New Zealand rabbits (~2.5kg) were pre-medicated with a combination of Medetomidine (Domitor®) 0.5ml/kg *i.m.*, and Ketamine (Vetalar®) 0.25ml/kg *i.m.* whilst maintaining oxygen intake via a face mask. The rabbits were tracheotomised using a Portex™ uncuffed endotracheal tube 3 ID., connected to ventilator and maintained at a ventilation rate of 30-40 breaths per minute, with an approximate tidal volume of 18-20 ml, and a maximum airway pressure of 10 cm $H_2O$. Anaesthesia was then switched to Isoflurane and ventilation continued with $O_2$ at 2l/min. The right marginal ear vein was cannulated using a 23G or 24G catheter, and

2079

2080

Lactated Ringer solution perfused at 0.5ml/min. The rabbit was maintained at 3% Isoflurane during invasive surgery, dropping to 2% for maintenance anaesthesia.

### 3.2 *Cannulation of Vessels*

The left groin area of the rabbit was shaved and a vertical incision was made approximately 5cm in length along the thigh. The femoral vein and artery were exposed, isolated and then cannulated with a PVC catheter (17G) for the infusion of drugs and compounds. Cannulation was repeated for the femoral artery, inserting the catheter to a depth of 10cm to ensure that the catheter reached the abdominal aorta. This arterial catheter was linked to a Gould system to record blood pressure. Samples for blood gas analysis were also taken via the arterial catheter. Systolic and diastolic pressures were measured, and the mean arterial pressure calculated using the formula (diastolic x2 + systolic) ÷3. Heart rate was measured via the pulse oxymeter and *Po-ne-mah* data acquisition software system (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems Inc).

### 3.3 *Stimulation of the Pelvic Nerve*

A ventral midline incision was made into the abdominal cavity. The incision was about 5cm in length just above the pubis. The fat and muscle was *bluntly* dissected away to reveal the hypogastric nerve which runs down the body cavity. It was essential to keep close to the side curve of the pubis wall in order to avoid damaging the femoral vein and artery which lie above the pubis. The sciatic and pelvic nerves lie deeper and were located after further dissection on the dorsal side of the rabbit. Once the sciatic nerve is identified, the pelvic nerve was easily located. The term *pelvic nerve* is loosely applied; anatomy books on the subject fail to identify the nerves in sufficient detail. However, stimulation of the nerve causes an increase in vaginal and clitoral blood flow, and innervation of the pelvic region. The pelvic nerve was freed away from surrounding tissue and a *Harvard* bipolar stimulating electrode was placed around the nerve. The nerve was slightly lifted to give some tension, then the electrode was secured in position. Approximately 1ml of light paraffin oil was placed around the nerve and electrode. This acts as a protective lubricant to the nerve and prevents blood contamination of the electrode. The electrode was connected to a *Grass* S88 Stimulator. The pelvic nerve was stimulated using the following parameters:- 5V, pulse width 0.5ms, duration of stimulus 10 seconds and a frequency range of 2 to 16Hz. Reproducible responses were obtained when the nerve was stimulated every 15-20 minutes.

A frequency response curve was determined at the start of each experiment in order to determine the optimum frequency to use as a sub-maximal response, normally 4Hz. The compound(s) to be tested were infused, via the femoral vein, using a *Harvard* 22 infusion pump allowing a continuous 15 minute stimulation cycle.

### *3.4 Positioning of the Laser Doppler Probes*

A ventral midline incision was made, at the caudal end of the pubis, to expose the pubic area. Connective tissue was removed to expose the tunica of the clitoris, ensuring that the wall was free from small blood vessels. The external vaginal wall was also exposed by removing any connective tissue. One laser Doppler flow probe was inserted 3cm into the vagina, so that half the probe shaft was still visible. A second probe was positioned so that it lay just above the external clitoral wall. The position of these probes was then adjusted until a signal was obtained. A second probe was placed just above the surface of a blood vessel on the external vaginal wall. Both probes were clamped in position.

Vaginal and clitoral blood flow was recorded either as numbers directly from the Flowmeter using *Po-ne-mah* data acquisition software (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument Systems Inc), or indirectly from Gould chart recorder trace. Calibration was set at the beginning of the experiment (0-125ml/min/100g tissue).

### *3.5 Infusion of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP)*

The doses of VIP (Bachem, H-3775) infused were 2.0, 6.0, 20.0, 60.0 µg/kg *i.v.* and were infused in a volume of 0.5 ml of saline. VIP was infused using a Harvard 22 pump, infusing at 500µl/min via a 3-way tap into the femoral vein. After VIP infusion, the catheter was flushed with heparinised saline (Hepsaline) so that no VIP was left in the catheter.

For experiments using VIP infusions, there was a need for an initial sensitising dose response curve (2-60µg/kg), in order that reproducible responses could be obtained. An initial infusion of Hepsaline (50UI/ml) was infused to act as a negative control.

### *3.6 Infusion of Inhibitors*

NEP (Neutral Endopeptidase EC3.4.24.11) inhibitors, phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors and NPY Y1 antagonists were made up in saline or 5% glucose solution (200µl 50% glucose in 1.8ml water for injection). $PDE_{cAMP}$ inhibitors were dissolved in a 40% ethanol solution (200µl 50% glucose in 1.8ml water/ethanol for injection). The inhibitors and vehicle controls were infused at the same rate as VIP. NEP inhibitors were left for 30 minutes prior to a VIP dose response curve, whilst NEP inhibitors, NPY Y1 receptor antagonists and $PDE_{cAMP}$ inhibitors were left for 15 minutes prior to pelvic nerve stimulation.

### *3.7 Measurement of smooth muscle relaxation in isolated rabbit vagina*

3.7 (a). Rabbit vagina *in vitro* preparation:- Female New Zealand white rabbits (2.0 - 3.0 kg) were killed by cervical dislocation. The abdominal cavity was opened and the vagina excised. Tissue strips were mounted longitudinally in Wesley Co. 5ml silanised organ chambers with braided silk sutures (6/0 gauge) at an initial resting tension of 1.5g in Krebs bicarbonate buffer maintained at 37°C and gassed with $95\%O_2/5\%CO_2$. The upper ligature of each tissue strip was attached to a 10g capacity force-displacement transducer and changes in isometric force were measured and recorded using a DART *in vitro* data capture system. Tissues were allowed to equilibrate for 1.5 hours and were regularly washed with Krebs.

3.7 (b). Vasoactive intestinal peptide-induced relaxation of rabbit vagina:- Each tissue was contracted using 1µM bath concentration of phenylephrine. When the contractile response reached a stable plateau (~15 minutes), VIP was cumulatively added to the organ chamber at log units to produce concentrations from 0.1 - 100nM. The relaxation responses were measured 5 minutes after the addition of each concentration of VIP; maximum relaxation was achieved by this time. Tissues then received either a test agent (eg NEP or PDE inhibitor) or DMSO vehicle (time matched control).

3.7 (c). Analysis of data for VIP relaxation experiments:- For each VIP concentration relaxation-response curve, the relaxation responses induced by VIP were expressed as a percentage of the maximum phenylephrine induced contraction. These values were then plotted against log VIP concentration and sigmoidal curves were fitted.

For the purpose of curve fitting the minimum relaxation response was constrained to 0 % and the maximum relaxation response was allowed to free fit. The concentration of VIP required to produce 50 % relaxation of the phenylephrine contraction ($EC_{50\ PE}$) was determined.

3.7 (d). Electrical field stimulated relaxation of rabbit vagina:- Rabbit vaginal strips were prepared as described in Section 3.7 (a). The tissue strips were mounted between two platinum electrodes placed at the top and bottom of the organ chamber approximately 4cm apart. Each tissue was contracted using 1µM bath concentration of phenylephrine. When the contractile response reached a stable plateau (15 minutes), the tissues underwent a pre-treatment electrical field stimulated (EFS) induced relaxation curve. This was performed between 40 - 60 volts using sequential frequencies of 2, 4, 8 and 16 Hz delivered as 10 second trains of 0.5 milli second pulse width. The tissues were allowed to return to base line pre-contractile tension between each frequency (5 minutes) and the size of the relaxation response recorded.

After completion of the pre-treatment EFS response curve, all tissues were washed for 15 minutes, allowing the tissues to return to the baseline tension. Tissues then received either a test agent (eg NEP or PDE inhibitor, nitric oxide synthase [NOS] inhibitor) or DMSO vehicle (time matched control). Tissues were re-contracted with phenylephrine (1µM) 15 minutes after the addition of compound or vehicle and an EFS-induced relaxation response curve determined as described above.

For EFS experiments the Krebs was supplemented with atropine (10µM) and guanethidine (150µM) to abolish any cholinergic or adrenergic neuronal innervations of the vagina.

### *3.8 Measurement of cAMP levels in isolated rabbit vagina*

Measurement of cAMP concentrations were made from vaginal tissue extracts using a Biotrak cAMP Enzyme immunoassay (EIA) kit (Amersham Life Sciences RPN 225). Isolated vaginal tissue samples were treated with test agents (eg forskolin or VIP). After 5 minutes the samples were snap frozen using liquid nitrogen, homogenised and cAMP was extracted. cAMP levels are measured by EIA. The EIA is based on

2081

competition between unlabelled cAMP and a fixed quantity of peroxidase labelled cAMP for a limited amount of cAMP specific antibody.

### *3.9 Measurement of phosphodiesterase (PDE) activity in isolated rabbit vagina*

Human vaginal wall cytosol extracts were obtained from ABS Inc., Delaware (Age of donors 41 and 60 years old). The PDE isoenzymes were separated by Mono-Q anion exchange chromatography and characterised based upon their substrate selectivity, sensitivity to allosteric modulators and *selective* inhibitors. Western analysis using specific PDE isoenzyme antibodies was also performed to detect PDE expression in the human vagina.

All data are reported as mean ± s.e.m.. Significant changes were identified using Student's t-tests.

## 4.0 Results and Discussion

### *4.1 Animal model of sexual arousal*

In our studies, we have developed a robust reproducible model of the physiology of sexual arousal. Using this anaesthetised rabbit model, we are capable of measuring small changes in genital blood flow using Laser Doppler technology. Stimulation of the pelvic nerve is used to simulate the neuronal effects of sexual arousal.

We found that stimulation of the pelvic nerve induces frequency-dependent increases in vaginal and clitoral blood flow (See Figure 1). The increases in vaginal blood flow are significant when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall. Stimulation of the pelvic nerve at 2Hz induced a mean maximum vaginal blood flow elevation of 10.3±1.8, at 4Hz 20.0±4.6, 8Hz 36.3±4.8 and 16Hz 46.6+4.7 ml/min/100g tissue (n=4); 15-20V, 0.5ms, 10s) and increases in clitoral blood flow of 14.7±3.6 at 2Hz, 29.4±1.4 at 4Hz and 69.7±2.1 at 8Hz. These values are of similar amplitude to those previously observed in human studies and animal models of arousal (Berman, 1999a; Park, 1997).

We found that submaximal stimulation of the pelvic nerve results in reproducible increases in genital blood flow (eg stimulating 4Hz every 15 minutes gave a mean increase of in vaginal blood flow of 8.50±0.10ml/min/100g tissue n=8 and a mean increase in clitoral blood flow of 13.65±0.86ml/min/100g tissue n=11). This reproducibility is maintained for up to 5 hours. We can use the reproducibility of these responses to investigate a.) the identity of endogenous vasoactive agents/mechanisms which mediate genital engorgement, and b.) the influence of drugs which may be efficacious in enhancing vaginal and/or clitoral blood flow.

We found that there are no adverse cardiovascular effects associated with pelvic nerve stimulation in the anaesthetised rabbit (See Figure 3).

Genital blood flow is increased during sexual arousal (Berman, 1999) via an increased arterial blood supply - the vaginal artery, the vaginal branch of the uterine artery, the internal pudendal artery and the middle branches of the middle rectal artery are all involved in supplying blood to the vagina and clitoris. The pelvic nerve which originates from S2/S4 spinal regions, innervates the female genitalia and has branches terminating in the lower vagina, clitoris and related blood vessels. By stimulating the pelvic nerve we can simulate the blood flow effects observed during sexual arousal i.e. an increase in arterial genital blood flow. Interestingly, the increased arterial blood flow is not mirrored by venous drainage allowing the capillary networks to become engorged with blood. Vaginal engorgement leads to vaginal lubrication, via increased plasma transudation and this is one of the first pelvic responses observed during sexual stimulation. The neurotransmitters that are released upon pelvic nerve stimulation or during sexual arousal are currently unidentified. Nerves containing neuropeptides and other neurotransmitter candidates that innervate the vasculature and microvasculature of the vagina and clitoris have been identified immunohistochemically. These studies indicate that calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NPY), nitric oxide synthase (NOS), substance P and vasoactive intestinal peptide (VIP) are all present in the nerves that innervate the human vagina and clitoris (Hoyle, 1996; Burnett, 1997; Hauser-Kronberger, 1999).

2082

### 4.2 *Validation of the anaesthetised rabbit model of sexual arousal*

In order to translate blood flow data generated using this model to those observed in a human model of sexual arousal, we directly compared our data with vaginal blood flow and cardiovascular data generated in pre-clinical studies.

We found that VIP infusion has the following effects in rabbit model of sexual arousal:-

- Exogenous VIP (*iv* bolus) induces significant concentration-dependent increases in vaginal blood flow (See Figure 2a). These increases are significantly elevated above basal blood flow values when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall. Vaginal blood flow was significantly increased by 24.7±3.6ml/min/100g tissue with an intravenous administration of VIP (60μg/kg). The blood flow remained elevated above basal for about 11 minutes post-infusion. Lower doses induced smaller increases eg 60.3μg/kg, elevated blood flow by 7.5±1.3ml/min/100g tissue and blood flow was elevated for 7 minutes post-infusion.

- Repetitive infusions of similar doses of VIP (*iv* at 30 minute intervals) induce significant reproducible increases in vaginal blood flow (See Figure 2b).

- VIP (*iv*) significantly increases heart rate and decreases mean arterial blood pressure (See Figure 3). At 6.0μg/kg VIP (*iv*) caused significant reduction in mean arterial blood pressure of 13.2±0.7mm Hg and a significant increase in heart rate of 16±4 beats per minute.

This animal model directly reflects the clinical data observed upon infusion of VIP into health volunteers ie increased vaginal blood flow, suppressed blood pressure and elevated heart rate. Therefore this model can be used to investigate the mechanism(s) that underlie physiological changes that occur during sexual arousal and additionally to validate novel approaches for the enhancement of vaginal blood flow and hence treatment of FSAD.

### 4.3 VIP-induces changes in vaginal blood flow via stimulation of the cAMP/adenylate cyclase pathway

Ottesen and co-workers demonstrated that VIP induces increases in vaginal blood flow and lubrication in healthy volunteers. However the mechanism by which VIP exerts it's effects are unclear. In the literature, there are plenty of examples of VIP signalling through different second messenger systems including cGMP/guanylate cyclase (Ashur-Fabian, 1999), carbon monoxide/heme oxygenase (Fan, 1998) and cAMP/adenylate cyclase (Schoeffter, 1985; Gu, 1992; Foda, 1995). This is exemplified by a recent report which describes how the relaxant effects of VIP in the uterine artery can be explained by the release of nitric oxide (Jovanovic, 1998). Interestingly there is also evidence for VIP modulating NO/cGMP in male urogenital function (Kim, 1994) and there is direct evidence that treatment of human vaginal smooth muscles cell cultures, with VIP (0.5μM) fails to elevate cAMP levels (Traish, 1999 *ibid*).

In this study we have shown that VIP induces vasorelaxation via elevation of intracellular cAMP levels. By conducting a series of functional experiments we have measured blood flow and smooth muscle relaxation in addition to biochemically measuring intracellular cAMP concentrations. We have used forskolin, an activator of adenylate cyclase or cAMPmimetic, to mimic the effects of activating the cAMP/adenylate cyclase pathway. VIP and forskolin have identical effects on the physiological arousal effects on vaginal blood flow and relaxation.

VIP (20μg/kg) and forskolin (40nmol/kg) induces significant increases in vaginal blood flow 13.2 and 12.7ml/min/100mg tissue respectively (See figures 2a and 4a). These changes in amplitude induced by VIP and forskolin were not significantly different. These increases are significantly elevated above basal blood flow values when recorded either on the intra- or extra-vaginal wall.

VIP (0.1μM) and forskolin (10μM) both significantly increased intracellular concentrations cAMP above basal levels in isolated vaginal tissue (See Figure 4b).

VIP (0.1μM) and forskolin (10μM) elevate basal concentrations from 276nM by 156% and 238% respectively. The differences in these percentages reflects the difference

2083

in concentrations of VIP and forskolin used eg VIP at a concentration of 0.1μM relaxes precontracted isolated vagina by circa 80% where as 10μM forskolin is sufficient to completely relax isolated tissue.

Additionally we showed that VIP and forskolin induces relaxation in isolated vaginal tissue with $EC_{50}$ values of 18.8±0.6nM and 320±20nM respectively (See Figure 4c).

These data establish that VIP induces vaginal vasorelaxation via the cAMP/adenylate cyclase pathway, hence this model can be used to investigate whether pelvic nerve stimulation, i.e. sexual arousal, leads to the release of VIP/activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway. In addition, approaches to enhance vaginal blood flow during sexual arousal, eg by directly or indirectly enhancing cAMP signalling, can also be investigated.

## *4.4* *cAMP is the mediator of vaginal vasorelaxation*

The neurotransmitter and second messenger candidates responsible for increases in vaginal blood flow during sexual arousal are currently unidentified. Todate, workers have focused on the nitric oxide (NO)/cGMP pathway. In accordance with the present invention, we have demonstrated that:- 1.) the cAMP/adenylate cyclase pathway mediates VIP-induced increases in vaginal blood flow; 2.) VIP is the endogenous neurotransmitter released during sexual arousal and 3.) endogenously released VIP induces it's vasorelaxant effects via elevation of cAMP.

The neurotransmitter responsible for vaginal wall relaxation is currently unidentified. We have shown that VIP is the neurotransmitter release upon stimulation of the pelvic nerve and that cAMP mediates the VIP-mediated vasorelaxation. Agents that prevent the metabolism of VIP or directly enhance cAMP signalling enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow eg NEP inhibitors or $PDE_{cAMP}$ inhibitors respectively (see following sections).

In our studies, we have found that we believe that we can exclude a role for NO in arousal-induced increases in vaginal blood flow. In this respect, we have shown that a potent and selective PDE type 5 inhibitor has no effect on either pelvic nerve stimulated- or VIP-induced increases in vaginal blood flow (-5.3±5.5% change in blood flow at 60μg/kg). Additionally a PDE type 5 inhibitor has a minimal effect on

VIP- or electrical field stimulated (EFS)- ·induced-relaxations of isolated vaginal smooth muscle (30% enhancement of VIP-induced relaxations; See table 1).

Table 1:- Enhancement of VIP mediated relaxation of isolated rabbit vagina. This table illustrated the percentage enhancement of the $EC_{50}$ for VIP-induced relaxations of precontracted vaginal smooth muscle (1μM phenylephrine). Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ types 1, 2, 3 and 4 all significantly potentiated VIP-mediated relaxations whereas a selective inhibitor of $PDE_{cGMP}$ type 5 or vehicle control had no effect on VIP-mediated relaxations.

| PDE inhibitor at selective dose | Percentage enhancement of VIP-induced relaxation |
|---|---|
| $PDE_{cAMP}$ type 1 | 210% |
| $PDE_{cAMP}$ type 2 | 130% |
| $PDE_{cAMP}$ type 3 | 220% |
| $PDE_{cAMP}$ type 4 | 160% |
| $PDE_{cGMP}$ type 5 | No effect (30%) |
| Control - vehicle | No effect |

We have shown that VIP is also the endogenous NANC (non-adrenergic, non-cholinergic) neurotransmitter partially responsible for EFS-induced relaxations of isolated vaginal smooth muscle. A high dose of a nitric oxide synthase inhibitor (L-NOARG, 300μM) only inhibits 50% of EFS-induced relaxations. A NEP inhibitor (1μM), which will prevent NEP-induced metabolism of VIP and hence enhance VIP signalling, enhances the non-nitric oxide NANC relaxation induced by EFS. We have shown that both NO and VIP regulate smooth muscle tone in the vaginal wall. Therapeutically it will be possible to enhance relaxations of vaginal smooth muscle with agents that enhance NO/cGMP and/or VIP/cAMP mediated signalling.

### *4.5 VIP induces clitoral vasorelaxation via the cAMP pathway*

The neurotransmitter and second messenger candidates responsible for increases in clitoral blood flow during sexual arousal are currently unidentified. In line with current research into vaginal blood flow, work has speculated and focused on the nitric oxide (NO)/cGMP pathway. There are no reports that VIP plays a role in mediating clitoral blood flow/engorgement although VIP containing neurones have been visualised in clitoral tissue (Hauser-Kronberger *et al.*, 1999).

In this study we demonstrate that:-

1. Infusion of VIP increases clitoral blood flow

2. The cAMP/adenylate cyclase pathway mediates VIP-induced increases in clitoral blood flow

3. VIP is an endogenous clitoral neurotransmitter that is released during sexual arousal:

1. Infusion of VIP (60-200μg/kg, *iv* bolus) induces a concentration dependant increase in clitoral blood flow (figure 5). A 115% increase in clitoral blood flow was observed after an iv infusion of 200μg/kg VIP. This was significantly elevated from control infusions (Hepsaline).

2. The effects of VIP on clitoral blood flow can be mimicked by an infusion of a cAMP mimetic forskolin (40nmol/kg *iv* bolus, Figure 5). A 156% increase in clitoral blood flow was observed after an iv infusion of 40nmol/kg forskolin. This was significantly elevated from control infusions (Hepsaline). Note the amplitude of the response is similar to that induced by VIP (200μg/kg, *iv* bolus) and comparable to those observed on vaginal blood flow in Figs 2 and 4.

3. Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 at clinically relevant doses significantly enhance pelvic nerve stimulated increases in clitoral blood flow (See Figure 12). A NEP inhibitor enhanced the peak increase in clitoral blood flow by up to 131% compared to vehicle control increases.

These data establish that VIP is capable of increasing clitoral blood flow/vasorelaxation and that this can be mimicked by activation of the cAMP/adenylate cyclase pathway. The finding that an inhibitor of NEP EC3.4.24.11 (responsible for VIP metabolism) enhances pelvic nerve stimulated increase in clitoral blood flow demonstrates that VIP is a neurotransmitter that is released during pelvic nerve stimulation/sexual arousal.

## 4.6 *Genital blood flow is enhanced by pharmacological agents that directly or indirectly elevate cAMP levels*

FSAD is associated with and may result from reduced genital blood flow. Potential approaches to treat this disorder revolve around enhancing genital blood flow. Having established that cAMP is the mediator of genital vasorelaxation and that elevations of cAMP result from neuronally released VIP, we believe that if cAMP signalling is enhanced, then as a consequence genital blood flow will be increased, hence restoring genital blood flow to normal levels and treating FSAD.

In a highly preferred aspect, we chose three targets to directly or indirectly enhance cAMP-mediated vasorelaxation - $PDE_{cAMP}$ inhibitors, eg $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitors, NEP (EC 3.4.24.11) inhibitors and neuropeptide Y Y1 (NPY Y1) receptor antagonists.

### 4.6.1 Neutral Endopeptidase (NEP EC 3.4.24.11) inhibitors

NEP EC 3.4.24.11 metabolises VIP and hence terminates VIP-mediated biological activity. NEP inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of VIP released during arousal. This will have the clinical effect of enhancing genital engorgement.

There have been no previous literature reports of NEP EC3.4.24.11 localisation or of it's functional role in vaginal tissue or a role in sexual arousal.

Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 at clinically relevant doses significantly enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow (See Figure 6).

A NEP inhibitor enhanced the peak increase in vaginal blood flow by up to 53% compared to time matched control increases. This enhancement of submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz), was dose dependant eg 0.1mg/kg iv induced a 35.0±7.6% increase; 0.3mg/kg iv induced a 42.6.0±27.7% increase and 1.0mg/kg iv induced a 52.8±32.5% increase. NEP inhibitors had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow. Hence, the agents of the present invention enhance arousal, by potentiating cAMP signalling, rather than induce arousal in the absence of sexual desire ie by direct increasing cAMP signalling.

2085

Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11 at clinically relevant doses significantly enhance pelvic nerve stimulated increases in clitoral blood flow (See Figure 12). A NEP inhibitor enhanced the peak increase in clitoral blood flow by up to 131% compared to vehicle control increases. NEP inhibitors had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow. This further supports our believe that the agents of the present invention will enhance arousal, by potentiating cAMP signalling, rather than induce arousal in the absence of sexual desire i.e. by direct increasing cAMP signalling.

Selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11, at clinically relevant doses, enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow when compared to time-matched controls. At submaximal doses of VIP (eg. 6.0μg/kg) a significant potentiation in both the peak increase (95±6%) and prolongation of the duration of the enhancement (*circa* 140% - from 7 to in excess of 17 minutes; See Figure 7). NEP inhibitors significantly prolong the duration of VIP-induced elevation of vaginal blood flow when given in combination with dose of VIP that produce maximal flow increases (*circa* 80% increase in duration - 11 to 20 minutes).

NEP inhibitors at clinically relevant doses significantly enhance VIP-induced and nerve-mediated relaxations in isolated tissue. The $EC_{50}$ for VIP is significantly reduced from 18.8±0.6nM to 2.9±0.3nM in the presence of a selective NEP inhibitor (1μM). The effect of the NEP inhibitor is concentration dependent.

NEP EC 3.4.24.11 mRNA message and protein is expressed and has been identified in human and rabbit vagina by Northern and Western analyses.

### 4.6.2 Phosphodiesterase (PDE) inhibitors

cAMP is degraded by cAMP-hydrolysing PDEs ie. $PDE_{cAMP}$. $PDE_{cAMP}$ inhibitors will potentiate the endogenous vasorelaxant effect of cAMP released during arousal. This should have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

There are no literature reports of $PDE_{cAMP}$ localisation or of a functional role of these isozymes in vaginal tissue or a role in sexual arousal. We have shown by PDE profiling of human and rabbit vagina that the following $PDE_{cAMP}$ 1, 2, 3, 4, 7 & 8 isozymes are present. Inhibitors of these $PDE_{cAMP}$ represent potential agents to enhance vaginal blood flow and/or relax vaginal smooth muscle.

A selective inhibitor of $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor at clinically relevant doses significantly enhances pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow (See Figure 8). A $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor (500μg/kg; iv) enhanced the peak increase in vaginal blood flow by 86.8±21.9% compared to increases observed during time matched control (@4Hz).

A selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor significantly enhanced the duration of VIP (60μg/kg)-induced increases in peak vaginal blood flow by over 100% (measured at 50% amplitude;. See Figure 9). The selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor significantly enhances the peak increase in blood flow induced by VIP-stimulation (circa 15±3% [200μg/kg]).

significantly enhanced the duration of VIP-induced increases in peak vaginal blood flow by over 100% (measured at 50% amplitude; See Figure 8). The selective $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor significantly enhances the peak increase in blood flow induced by pelvic nerve stimulation (circa 15±3% [200μg/kg] at 4Hz).

$PDE_{cAMP}$ inhibitors enhance VIP-induced relaxations of precontracted isolated vaginal smooth muscle (1μM phenylephrine; See Table 1). Selective inhibitors of $PDE_{cAMP}$ types 1, 2, 3 and 4 all significantly potentiated VIP-mediated relaxations. (210% @ 76nM, 130% @ 8nM, 220% @ 3.4μM and 160% @ 686nM potentiation of VIP $EC_{50}$ values) These inhibitors were administered at dose known to be selective for the particular $PDE_{cAMP}$ of interest. A selective inhibitor of $PDE_{cGMP}$ type 5 or vehicle control had no viable effect on VIP-mediated relaxations.

### 4.6.3 NPY Y1 receptor antagonists

NPY exerts an inhibitory influence over VIP-mediated vasorelaxation and NPY Y1 receptor antagonists will facilitate the vasorelaxant effect of endogenous VIP released during arousal. This will have the clinical effect of enhancing vaginal engorgement.

2086

There are no literature reports of NPY receptor localisation or of a functional role for these receptors in vaginal tissue or a role in sexual arousal.

NPY receptor expression studies have identified by Northern and Western analyses that NPY $Y_1$ $Y_2$ and $Y_5$ receptor subtypes are present in human and rabbit vagina.

Selective inhibitors of NPY Y1 at clinically relevant doses significantly enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow (See Figure 10). An NPY Y1 antagonist enhanced the peak increase in vaginal blood flow by up to 92% compared to time matched control increases. This enhancement of submaximal stimulation frequencies (eg 4Hz), was dose dependant eg 0.01mg/kg iv induced a 15.8±19.6% increase; 0.03mg/kg iv induced a 35.1±17.17% increase; 0.10mg/kg iv induced a 60.1±16.9% increase and 0.3mg/kg iv induced a 91.9±27.4% increase (mean±sem n=3). NPY Y1 antagonists had no effect on basal (unstimulated) vaginal blood flow. This reinforces our view that they will enhance arousal, by potentiating cAMP signalling, rather than induce arousal in the absence of sexual desire ie by direct increasing cAMP signalling.

### *4.7 Effects of agents that enhance cAMP or increase vaginal blood flow on the mean arterial blood pressure in the anaesthetised rabbit*

In the search for an oral therapy for FSAD it is desirable that there are no associated adverse cardiovascular effects eg effect on blood pressure or heart rate. In our studies, we have found that infusions of VIP significantly reduce mean arterial blood pressure (See Figure 3) and significantly increased heart rate. Hence, in a highly preferred aspect, the agent is not VIP. Pelvic nerve stimulation and inhibitors of $PDE_{cAMP}$ and NEP however had no effect on blood pressure. At 6.0µg/kg VIP (*iv*), caused a significant reduction in mean arterial blood pressure of 13.2±0.7mm Hg and a significant increase in heart rate of 16±4 beats per minute. At higher doses such as 60.0µg/kg VIP (*iv*) caused significant reduction in mean arterial blood pressure of 14.7±1.37mm Hg and this was associated with a significant increase in heart rate of 111±30 beats per minute which then increased mean arterial blood pressure by 8.5±1.4mm Hg.

## COMPOUNDS TESTED

A series of compounds mentioned above were tested in accordance with the present invention and were found to be effective in accordance with the present invention – i.e. they can act as $P_{cAMP}$ in order to treat FSD, in particular FSAD.

These compounds included:

Compound of Formula Ia ("FIa") – *viz* 5-[4-(diethylamino)benzyl]-1-methyl-3-propyl-6,7-dihydro-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-one. FIa may be prepared according to the teachings of EP-A-0911333 (Example 50 thereof).

Compound of Formula II ("FII") – *viz* 9-(1-acetyl-4-phenylbutyl)-2-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-one. FII may be prepared according to the teachings of EP-A-0771799 (Example 100 thereof).

Compound of Formula III ("FIII") – *viz* Milrinone. FIII is a commercially available product.

Compound of Formula IV ("FIV") – *viz* Rolipram. FIV is a commercially available product.

Compound of Formula V ("FV") – *viz* cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[[1-(2-carboxy-4-pentenyl)cyclopentyl]carbonyl]amino]-,1-ethyl ester. FV may be prepared according to the teachings of EP-A-0274234 (Example 300 thereof).

Compound of Formula VI ("FVI") – *viz* cyclohexanecarboxylic acid, 3-[[[1-(2-carboxy-4-pentenyl)cyclopentyl]carbonyl]amino]-. FVI may be prepared according to the teachings of EP-A-0274234 (Example 379 thereof).

In particular, FIa, FII, FIII and FIV are $PDE_{cAMP}$ inhibitors. FIa is a I:PDEI, FII is a I:PDEII, FIII is a I:PDEIII and FIV is a I:PDEIV.

The data for these compounds are presented above in the previous Example sections – for example see Table I.

2087

As is evident, these PDE$_{cAMP}$ inhibitors enhance VIP-induced relaxations of isolated tissue.

FII – which is a selective I:PDEII - enhances VIP-induced increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FII also enhances pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI are selective inhibitors of NEP EC 3.4.24.11.

The data presented above in the previous Example sections are for FVI. However, similar results were obtained for FV.

As is evident, FV and FVI enhance VIP-induced increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI also enhance pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow at clinically relevant doses.

FV and FVI also enhance VIP-induced and nerve-mediated relaxations of isolated tissue at clinically relevant doses.

Additional compounds that were tested and that proved to be effective included:

2-[(1-{[(1-benzyl-6-oxo-1,6-dihydro-3-pyridinyl)amino]carbonyl}cyclopentyl)methyl]-4-methoxybutanoic acid (F57)

2-{[1-({[3-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)propyl]amino}carbonylcyclopentyl]-methyl}-4-phenylbutanoic acid (F58)

(+)-2-{[1-({[2-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl]amino}carbonyl)cyclopentyl]-methyl}-4-phenylbutanoic acid (F59)

2-[(1-{[(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)amino]carbonyl}cyclopentyl)methyl]-4-phenylbutanoic acid (F60) cis-3-(2-methoxyethoxy)-2-[(1-{[(4-{[(phenylsulfonyl)amino]carbonyl}cyclohexyl)amino]carbonyl}cyclopentyl)methyl]propanoic acid (F61)

(+)-2-{[1-({[2-(hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl]amino}carbonyl)cyclopentyl]methyl}pentanoic acid (F62)

(+)-2-[(1-{[(5-ethyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)amino]carbonyl}cyclopentyl)methyl]pentanoic acid (F63)

2-({1-[(3-benzylanilino)carbonyl]cyclopentyl}methyl)pentanoic acid (F64)

2-[(1-{[(1-benzyl-6-oxo-1,6-dihydro-3-pyridinyl)amino]carbonyl}cyclopentyl)methyl]pentanoic acid (F65)

2-{[1-({[(1R,3S,4R)-4-(aminocarbonyl)-3-butylcyclohexyl]amino}carbonyl)cyclopentyl]methyl}pentanoic acid (F66)

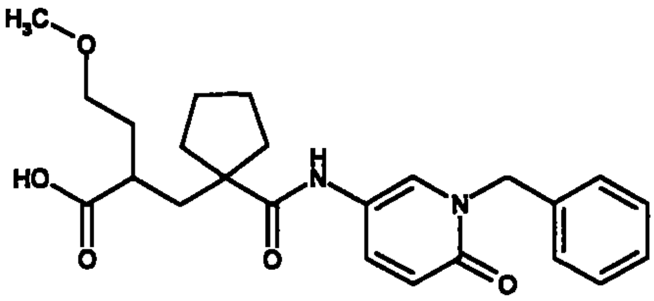
Each of compounds F57-66 is an I:NEP.

## SYNTHESIS OF COMPOUNDS F57-66

In the following commentary, the Preparation Examples are the synthesis of intermediates; whereas the Examples are the synthesis of the respective, compounds of the present invention.

### Example 1

### 2-[(1-{[(1-Benzyl-6-oxo-1,6-dihydro-3-pyridinyl)amino]carbonyl}cyclopentyl)methyl]-4-methoxybutanoic acid (F57)

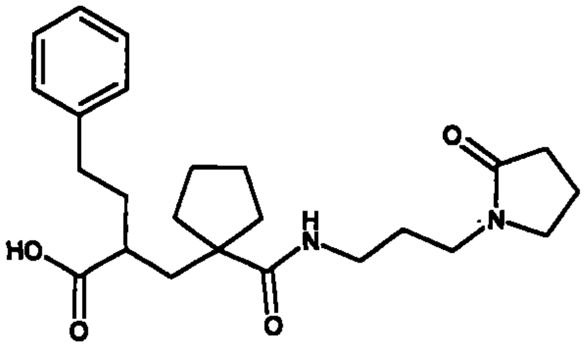


A mixture of the benzyl ester from preparation 1 (1/62) (850mg, 1.64mmol), and 5% palladium on charcoal (250mg) in 40% aqueous ethanol (21ml), was hydrogenated at 30 psi and room temperature for 30 minutes. The reaction mixture was filtered through Hyflo®, and the filtrate evaporated under reduced pressure. The residual foam was purified by column chromatography on silica gel using dichloromethane:methanol (97:3) as eluant to give the title compound as a white foam, 550mg, 79%; $^1$H NMR (DMSO-$d_6$, 300MHz) d: 1.24-2.17 (m, 12H), 2.18-2.31 (m, 1H), 3.07 (s, 3H), 3.21 (t, 2H), 5.08 (s, 2H), 6.63 (d, 1H), 7.23-7.41 (m, 5H), 7.72 (d, 1H), 8.24 (s, 1H).

Anal. Found: C, 67.46; H, 7.18; N, 6.24. $C_{24}H_{30}N_2O_5$ requires C, 67.58; H, 7.09; N, 6.57%.

### Example 2

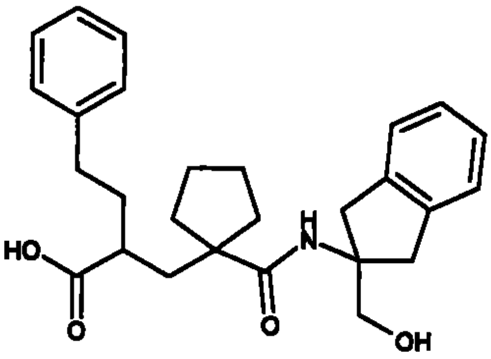
### 2-{[1-({[3-(2-Oxo-1-pyrrolidinyl)propyl]amino}carbonylcyclopentyl]-methyl}-4-phenylbutanoic acid. (F58)



A mixture of the benzyl ester from preparation 3 (3/67) (780mg, 1.55mmol) and 10% palladium on charcoal (100mg) in ethanol:water (90:10 by volume), (30ml) was hydrogenated at room temperature under 60psi $H_2$ pressure for 1.5 hours. The catalyst was filtered off, and the filtrate evaporated under reduced pressure to provide the title compound as a white foam, 473mg, 74%; $^1$H NMR ($CDCl_3$, 300MHz) d : 1.26-1.77 (m, 10H), 1.78-2.46 (m, 11H), 2.49-2.70 (m, 2H), 2.95-3.36 (m, 4H), 6.92-7.38 (m, 5H); Anal. Found: C, 64.05; H, 7.73; N, 6.22. $C_{24}H_{34}N_2O_4$;$0.75H_2O$ requires C, 65.88; H, 7.83; N, 6.40%.

## Example 3

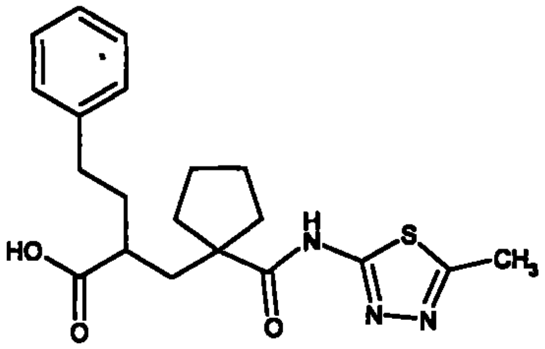
## (+)-2-{[1-({[2-(Hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl]amino}carbonyl)cyclopentyl]-methyl}-4-phenylbutanoic acid (F59)



2-{[1-({[2-(Hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl]amino}carbonyl)cyclopentyl]-methyl}-4-phenylbutanoic acid (WO 9110644) may be purified by standard HPLC procedures using an AD column and hexane:isopropanol:trifluoroacetic acid (70:30:0.2) as eluant, to give the title compound of example 3, 99.5% ee; $[\alpha]_D = +9.1°$ (c = 1.76 in ethanol)

## Example 4

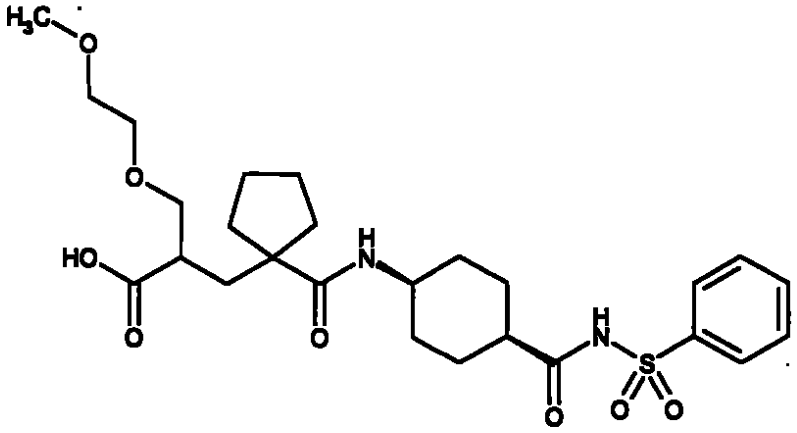
## 2-[(1-{[(5-Methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)amino]carbonyl}cyclopentyl)methyl]-4-phenylbutanoic acid (F60)



A mixture of the benzyl ester from preparation 4 (4/70) (187mg, 0.39mmol) and 10% palladium on charcoal (80mg) in ethanol (20ml) was hydrogenated at 60 psi for 18 hours. Tlc analysis showed starting material remaining, so additional 10% palladium on charcoal (100mg) was added, and the reaction continued for a further 5 hours. Tlc analysis again showed starting material remaining, so additional catalyst (100mg) was added, and hydrogenation continued for 18 hours. The mixture was filtered through Arbocel , and the filtrate concentrated under reduced pressure, and azeotroped with dichloromethane. The crude product was purified by chromatography on silica gel using a Biotage® column, and dichloromethane:methanol (95:5) as eluant to afford the title compound as a clear oil, 80mg, 53%; $^1$H NMR ($CDCl_3$, 300MHz) d: 1.51-1.89 (m, 9H), 2.03 (m, 1H), 2.20 (m, 1H), 2.40 (m, 2H), 2.60 (m, 5H), 7.15-7.30 (m, 5H); LRMS : m/z 387.8 ($MH^+$).

## Example 5

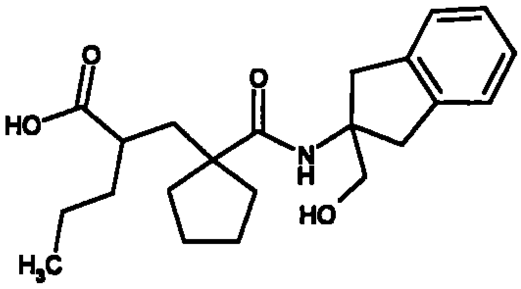
## Cis-3-(2-Methoxyethoxy)-2-[(1-{[(4-{[(phenylsulfonyl)amino]carbonyl}cyclohexyl)-amino]carbonyl}cyclopentyl)methyl]propanoic acid (F61)



A solution of the *tert*-butyl ester from preparation 8 (8/66) (446mg, 0.75mmol) in dichloromethane (5ml) and trifluoroacetic acid (5ml) was stirred at room temperature for 18 hours. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, and the residue azeotroped with dichloromethane, then toluene, and finally ether, to afford the title compound as a white foam, 385mg, 95%; $^1$H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) d: 1.48-2.17 (m, 18H), 2.40 (s, 1H), 2.66 (s, 1H), 3.37 (s, 3H), 3.50-3.70 (m, 6H), 3.94 (s, 1H), 6.10 (d, 1H), 6.59 (s, 1H), 7.55 (t, 2H), 7.61 (m, 1H), 8.02 (d, 2H), 9.11 (s, 1H); Anal. Found: C, 54.88; H, 6.90; N, 5.04. $C_{26}H_{38}N_2O_8S$;1.7$H_2O$ requires C, 57.97; H, 7.11; N, 5.20%.

### Example 6

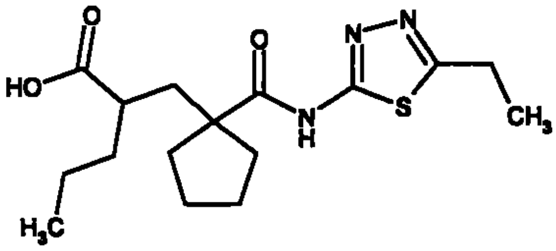
(+)-2-{[1-({[2-(Hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl]amino}carbonyl)cyclopentyl]-methyl}pentanoic acid (F62)



2-{[1-({[2-(Hydroxymethyl)-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl]amino}carbonyl)cyclopentyl]-methyl}pentanoic acid (WO 9110644) was further purified by HPLC using an AD column and hexane:isopropanol:trifluoroacetic acid (90:10:0.1) as eluant, to give the title compound of example 6, 99% ee, $[\alpha]_D = +10.4°$ (c = 0.067, ethanol).

### Example 7

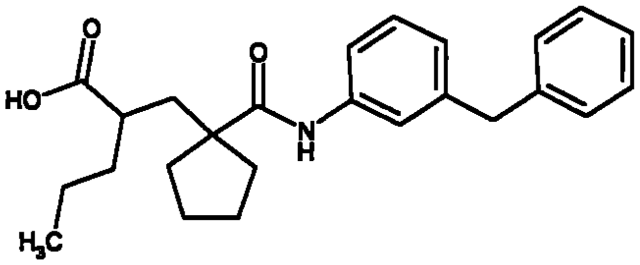
(+)-2-[(1-{[(5-Ethyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)amino]carbonyl}cyclopentyl)methyl]pentanoic acid (F63)



The acid from Preparation 18 (18/ex4) (824mg) was further purified by HPLC using an AD column and using hexane:*iso*-propanol:trifluoroacetic acid (85:15:0.2) as eluant to give the title compound of example 7 as a white foam, 386mg, 99% ee, $^1$H NMR (CDCl$_3$, 400MHz) δ: 0.90 (t, 3H), 1.38 (m, 6H), 1.50-1.79 (m, 9H), 2.19 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 2.44 (m, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.98 (q, 2H), 12.10-12.27 (bs, 1H); LRMS: m/z 338 ($MH^-$); and $[\alpha]_D = +3.8°$ (c = 0.1, methanol)

## Example 8

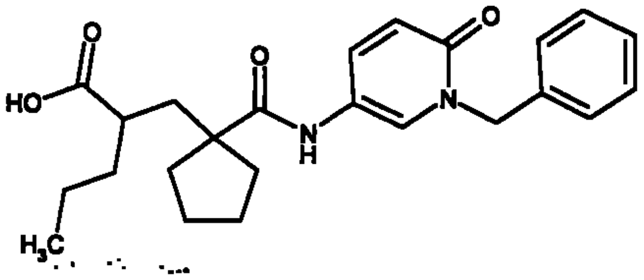
### 2-({1-[(3-Benzylanilino)carbonyl]cyclopentyl}methyl)pentanoic acid (F64)



A mixture of the benzyl ester from preparation 10 (10/53) (1.3mg, 2.47mmol) and 5% palladium on charcoal (130mg) in water (10ml) and ethanol (40ml) was hydrogenated at 30 psi and room temperature for 2 hours. The reaction mixture was fiiltered through Arbocel®, the filtrate concentrated under reduced pressure, and the residue triturated with dichloromethane. The residual gum was triturated with ether, then hexane, and dried at 50°C, to give the title compound as a solid, 0.79g, 81%; $^1$H NMR ($CDCl_3$, 300MHz) d: 0.95 (t, 3H), 1.24-1.51 (m, 3H), 1.58-1.80 (m, 7H), 1.88 (dd, 1H), 2.15 (m, 2H), 2.24 (m, 1H), 2.48 (m, 1H), 4.00 (s, 2H), 6.98 (d, 1H), 7.24 (m, 6H), 7.40 (m, 3H); Anal. Found: C, 75.48; H, 7.76; N, 3.59. $C_{25}H_{31}NO_3$;$0.25H_2O$ requires C, 75.44; H, 7.98; N, 3.51%.

## Example 9

### 2-[(1-{[(1-Benzyl-6-oxo-1,6-dihydro-3-pyridinyl)amino]carbonyl}-cyclopentyl)methyl]-pentanoic acid (F65)



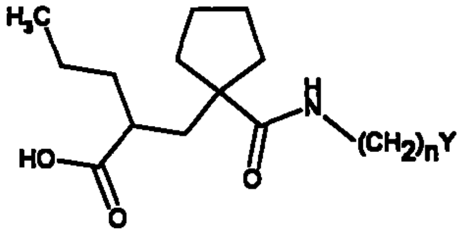
The title compound was obtained as a white foam in 51% yield from the benzyl ester from preparation 13 (13/56), following a similar procedure to that described in Preparation 19 (19/ex21), except, the product was purified by column chromatography on silica gel, using ethyl acetate as eluant; $^1$H NMR ($CDCl_3$,

300MHz) d: 0.96 (t, 3H), 1.28-1.80 (m, 12H), 2.01 (m, 1H), 2.30-2.52 (m, 2H), 5.02 (dd, 2H), 6.60 (d, 1H), 7.27 (m, 5H), 7.70 (s, 1H), 8.34 (s, 1H); Anal. Found: C, 69.52; H, 7.41; N, 6.51. $C_{24}H_{30}N_2O_4$;0.25$H_2O$ requires C, 69.45; H, 7.41; N, 6.75.

## Example 10

## 2-{[1-({[(1R,3S,4R)-4-(aminocarbonyl)-3-butylcyclohexyl]amino}carbonyl)cyclopentyl]methyl}pentanoic acid (F66)

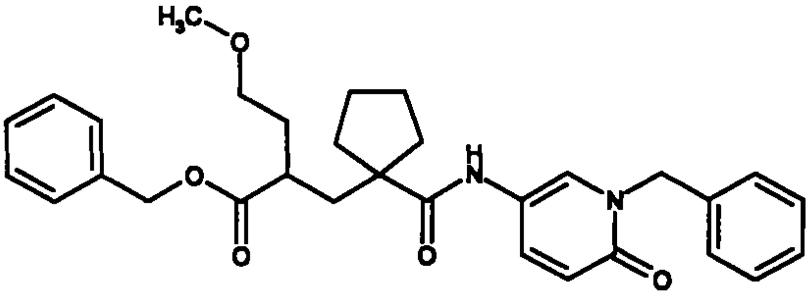
Compounds of formula ic, i.e. Compounds of general formula i where r$^1$ is propyl, where prepared from the corresponding *tert*-butyl ester, following a similar procedure to that described in Preparation 14 (14/ex1).



(Ic)

## Preparation 1 (1/62)

## Benzyl 2-[(1-{[(1-benzyl-6-oxo-1,6-dihydro-3-pyridinyl)amino]carbonyl}cyclopentyl)methyl]-4-methoxybutanoate



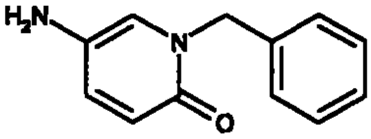
Oxalyl chloride (0.26ml, 3.0mmol) was added to an ice-cooled solution of 1-{2-[(benzyloxy)carbonyl]-4-methoxybutyl}cyclopentanecarboxylic acid (EP 274234) (1.0g, 3.0mmol) and N,N-dimethylformamide (2 drops) in dichloromethane (20ml), and the reaction stirred at room temperature for 2 hours. The solution was concentrated under reduced pressure and the residue azeotroped with dichloromethane (3x10ml). The product was dissolved in dichloromethane (20ml), then cooled in an ice-bath. The amine from preparation 2 (2/28) (600mg, 3mmol) and N-methylmorpholine (0.6ml, 5.45mmol) were added and the reaction stirred at room temperature for 18 hours. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure, and partitioned between water and ether. The organic layer was washed

2091

with hydrochloric acid (2N), sodium bicarbonate solution, then water, dried ($MgSO_4$) and evaporated under reduced pressure. The residual green solid was purified by medium pressure column chromatography on silica gel using ethyl acetate:hexane (90:10) as eluant to afford the title compound, 880mg, 57%; $^1$H NMR ($CDCl_3$, 300MHz) d: 1.37-2.28 (m, 12H), 2.46-2.64 (m, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.31 (m, 2H), 4.97 (dd, 2H), 5.08 (dd, 2H), 6.57 (d, 1H), 7.12 (m, 1H), 7.18-7.48 (m, 10H), 8.08 (d, 1H).

## Preparation 2 (2/28)

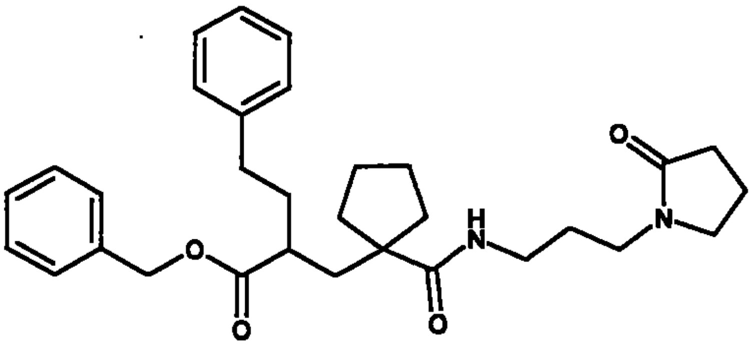
## 5-Amino-1-benzyl-2(1H)-pyridinone



A mixture of 1-benzyl-5-nitro-1H-pyridin-2-one (Justus Liebigs Ann. Chem. 484; 1930; 52) (1.0g, 4.35mmol), and granulated tin (3.5g, 29.5mmol) in concentrated hydrochloric acid (14ml) was heated at 90°C for 1.5 hours. The cooled solution was diluted with water, neutralised using sodium carbonate solution, and extracted with ethyl acetate (250ml in total). The combined organic extracts were filtered, dried ($MgSO_4$), and evaporated under reduced pressure to give the title compound as a pale green solid, (turned blue with time), 440mg, 51%; $^1$H NMR ($CDCl_3$, 250MHz) δ: 4.12-4.47 (bs, 2H), 5.00 (s, 2H), 6.31 (d, 1H), 6.86 (s, 1H), 7.07 (m, 1H), 7.14-7.42 (m, 5H).

## Preparation 3 (3/67)

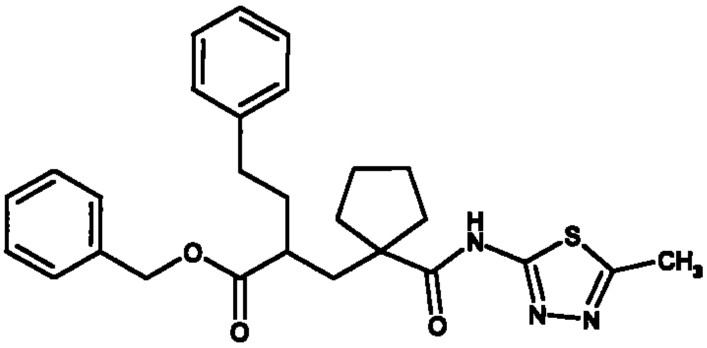
## Benzyl 2-{[1-({[3-(2-Oxo-1-pyrrolidinyl)propyl]amino}carbonylcyclopentyl]-methyl}-4-phenylbutanoate



1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.06g, 5.53mmol), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (0.60g, 4.44mmol) and 4-methylmorpholine (0.56g, 5.54mmol) were added sequentially to a cooled solution of 1-{2-[(benzyloxy)carbonyl]-4-phenylbutyl}cyclopentane-carboxylic acid (EP 274234) (1.5g, 3.94mmol) in dry dichloromethane (15ml) at room temperature, followed by N-(3-aminopropyl)-2-pyrrolidinone (0.56g, 3.94mmol), and the reaction stirred at room temperature for 18 hours. The mixture was washed with water, 2N hydrochloric acid, saturated aqueous sodium bicarbonate solution, and then dried ($MgSO_4$) and evaporated under reduced pressure. The residual yellow oil was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate:pentane (50:50) as the eluant to provide the title compound as a clear gum, 800mg, 40%; $^1$H NMR ($CDCl_3$, 300MHz) d : 1.37-2.20 (m, 16H), 2.34-2.58 (m, 5H), 2.92-3.46 (m, 6H), 5.07 (d, 1H), 5.18 (d, 1H), 6.98-7.47 (m, 10H).

### Preparation 4 (4/70)

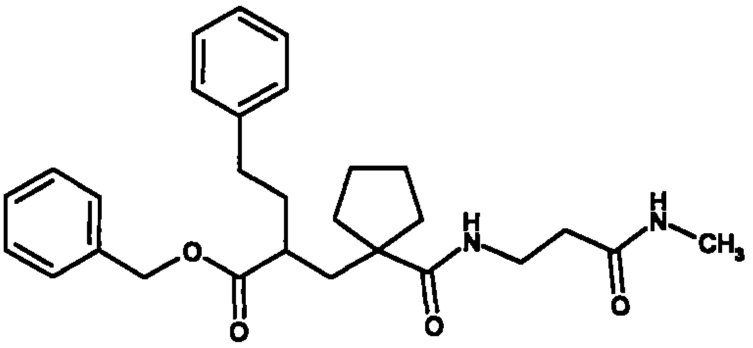
### Benzyl 2-[(1-{[(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)amino]carbonyl}cyclopentyl)methyl]-4-phenylbutanoate



The title compound was obtained as a clear oil in 74% yield from 1-{2-[(benzyloxy)carbonyl]-4-phenylbutyl}cyclopentane-carboxylic acid (EP 274234) and 2-amino-5-methyl-1,3,4-thiadiazole, following a similar procedure to that described in preparation 5 (5/68); $^1$H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) d: 1.58-1.76 (m, 7H), 1.83-1.98 (m, 3H), 2.03 (m, 1H), 2.20 (m, 1H), 2.35 (m, 1H), 2.44 (m, 3H), 2.65 (s, 3H), 5.02 (dd, 2H), 7.00 (d, 2H), 7.15 (m, 1H), 7.19 (m, 2H), 7.35 (m, 5H); LRMS : m/z 478.7 ($MH^+$).

## Preparation 5 (5/68)

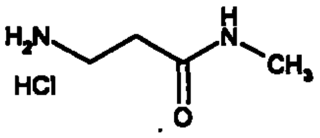
## Benzyl 2-{[1-({[3-(methylamino)-3-oxopropyl]amino}carbonyl)cyclopentyl]methyl}-4-phenylbutanoate



1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (122mg, 0.64mmol), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (86mg, 0.64mmol) and 4-methylmorpholine (173μl, 1.59mmol) were added sequentially to a cooled solution of 1-{2-[(benzyloxy)carbonyl]-4-phenylbutyl}cyclopentane-carboxylic acid (EP 274234) (202mg, 0.53mmol) in N,N-dimethylformamide (5ml) at room temperature, followed by the amine hydrochloride from preparation 6 (6/23) (146mg, 1.06mmol), and the reaction stirred at 90°C for 18 hours. The cooled solution was concentrated under reduced pressure and the residue partitioned between water (20ml) and ethyl acetate (100ml). The layers were separated, the organic phase washed with water (3x30ml), brine (25ml) dried ($MgSO_4$), and evaporated under reduced pressure to give a clear oil. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using dichloromethane:methanol (98:2) as eluant to afford the title compound as a colourless oil, 162mg, 67%; $^1$H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ: 1.38-1.53 (m, 2H), 1.53-1.96 (m, 8H), 2.02 (m, 2H), 2.27 (t, 2H), 2.46 (m, 3H), 2.76 (d, 3H), 3.44 (m, 2H), 5.13 (s, 2H), 5.79 (bs, 1H), 6.38 (m, 1H), 7.06 (d, 2H), 7.18 (m, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.38 (m, 5H); LRMS : m/z 465.5 (MH$^+$).

## Preparation 6 (6/23)

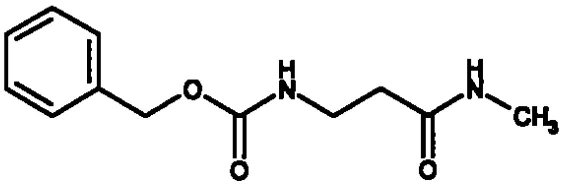
## 3-Amino-N-methylpropanamide hydrochloride



A mixture of the benzyl carbamate from preparation 7 (7/13) (7.92g, 33.5mmol) and 5% palladium on charcoal (800mg) in ethanol (300ml) was hydrogenated at 50 psi and room temperature for 4 hours. The reaction mixture was filtered through Arbocel , washing through with ethanol, and 1N hydrochloric acid (36.9ml, 36.9mmol) was added to the combined filtrate. This solution was evaporated under reduced pressure and the residue azeotroped with dichloromethane to afford the title compound as a colourless foam, 4.66g, $^1$H NMR (DMSO$d_6$, 300MHz) δ: 2.46 (t, 2H), 2.60 (s, 3H), 2.95 (m, 2H), 7.98-8.16 (m, 2H).

## Preparation 7 (7/13)

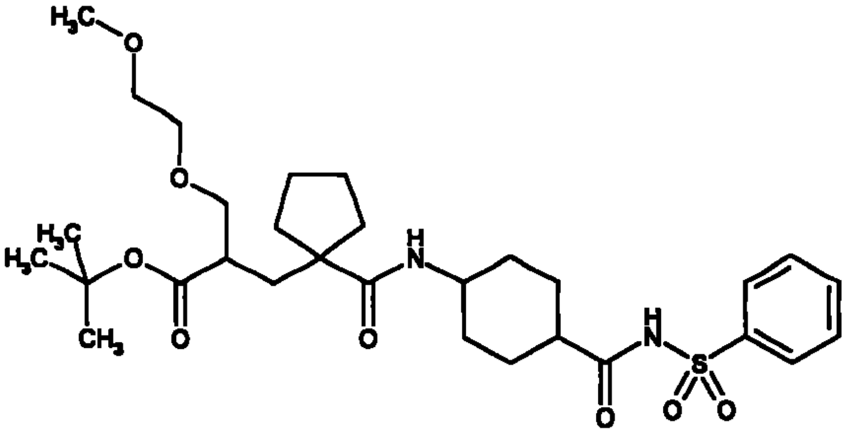
## Benzyl 3-(methylamino)-3-oxopropylcarbamate



A mixture of N-[(benzyloxy)carbonyl]-β-alanine (10g, 44.8mmol), methylamine hydrochloride (3.33g, 49.28mmol), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (6.05g, 44.8mmol), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (10.3g, 53.76mmol) and N-methylmorpholine (11.33ml, 103mmol) in dichloromethane (200ml) was stirred at room temperature for 18 hours. The resulting precipitate was filtered off to give the desired product as a colourless foam, and the filtrate evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using an elution gradient of ethyl acetate:hexane (90:10 to 100:0) to give additional product, 7.96g, 75% in total; $^1$H NMR ($CDCl_3$, 300MHz) δ: 2.42 (t, 2H), 2.80 (s, 3H), 3.50 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 5.49 (bs, 1H), 5.63 (bs, 1H), 7.36 (m, 5H); Anal. Found: C, 60.68; H, 7.00; N, 11.95. $C_{12}H_{16}N_2O_3$ requires C, 61.00; H, 6.83; N, 11.86%.

## Preparation 8 (8/66)

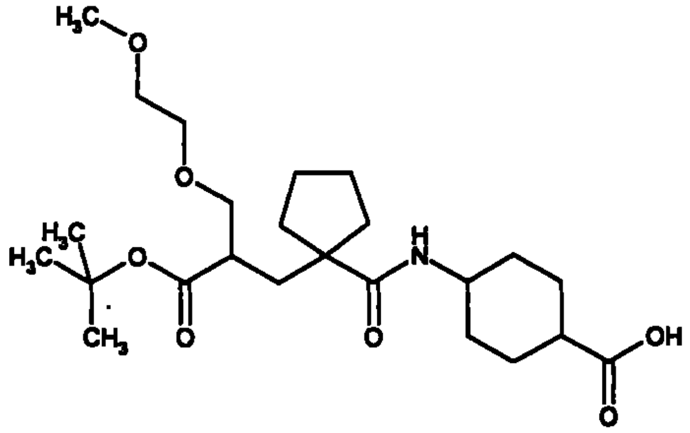
## Cis-tert-Butyl 3-(2-methoxyethoxy)-2-[(1-{[(4-{[(phenylsulfonyl)amino]carbonyl}-cyclohexyl)amino]carbonyl}cyclopentyl)methyl]propanoate



N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (199mg, 0.97mmol), 4-dimethylaminopyridine (118mg, 0.97mmol) and benzenesulphonamide (152mg, 0.97mmol) were added to an ice-cooled solution of the acid from preparation 9 (9/63) (400mg, 0.878mmol) in dichloromethane (12ml) and N,N-dimethylformamide (0.5ml), and the reaction stirred at room temperature for 20 hours. The mixture was concentrated under reduced pressure and the residue suspended in cold ethyl acetate. The resulting insoluble material was filtered off, the filtrate washed with hydrochloric acid (1N), and water, then dried ($MgSO_4$) and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using an elution gradient of dichloromethane:methanol (95:5 to 90:10) to afford the title compound as a white foam, 480mg, 92%; $^1H$ NMR ($CDCl_3$, 400MHz) d: 1.44 (s, 9H), 1.63 (m, 13H), 1.80 (m, 2H), 1.88 (m, 1H), 1.98 (m, 2H), 2.36 (m, 1H), 2.57 (m, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.40 (m, 1H), 3.51 (t, 2H), 3.58 (m, 3H), 3.95 (m, 1H), 5.92 (d, 1H), 7.56 (m, 2H), 7.62 (m, 1H), 8.05 (d, 2H), 8.75 (bs, 1H); LRMS : m/z 618 ($MNa^+$).

## Preparation 9 (9/63)

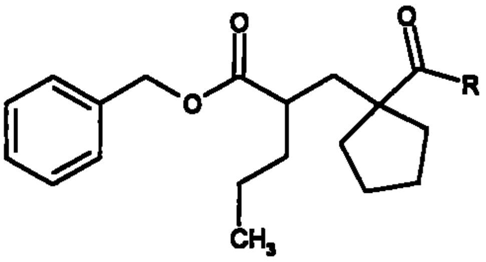
## 4-{[(1-{3-tert-Butoxy-2-[(2-methoxyethoxy)methyl]-3-oxopropyl}cyclopentyl)-carbonyl]amino}cyclohexanecarboxylic acid



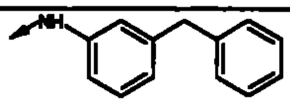
A mixture of benzyl 4-{[(1-{3-tert-butoxy-2-[(2-methoxyethoxy)methyl]-3-oxopropyl}cyclopentyl)carbonyl]amino}cyclohexanecarboxylate (EP 274234), and 10% palladium on charcoal (250mg) in water (10ml) and ethanol (50ml) was hydrogenated at 50 psi and room temperature for 18 hours. The reaction mixture was filtered through Solkafloc®, the filtrate concentrated under reduced pressure and the residue azeotroped with toluene (3x) and then dichloromethane (3x), to give the title compound, 2.0g, 96%; $^1H$ NMR ($CDCl_3$, 300MHz) d: 1.48 (s, 9H), 1.53-1.84 (m, 14H), 1.94-2.10 (m, 5H), 2.60 (m, 2H), 3.40 (s, 3H), 3.41-3.63 (m, 5H), 3.96 (m, 1H), 5.90 (bd, 1H).

## Preparation 10 (10/53)

The following compound:



where:

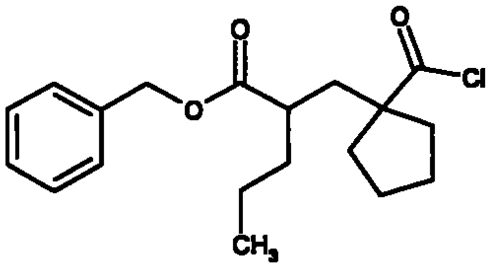
| Prep | R | Yield (%) | Data |
|---|---|---|---|
| 10<br>(10/53)[1] |  | 90 | $^1$H NMR (CDCl$_3$, 300MHz) δ: 0.84 (t, 3H), 1.24 (m, 2H), 1.40-1.76 (m, 7H), 1.84 (dd, 1H), 1.98 (m, 1H), 2.19 (dd, 1H), 2.28 (m, 1H), 2.56 (m, 1H), 3.98 (s, 2H), 4.99 (dd, 2H), 6.98 (d, 1H), 7.19-7.42 (m, 15H). |

1 = dichloromethane used as the column eluant

was prepared from the acid chloride from preparation 11 (11/3) and the appropriate amine, following a similar procedure to that described in preparation 12 (12/52).

## Preparation 11 (11/3)

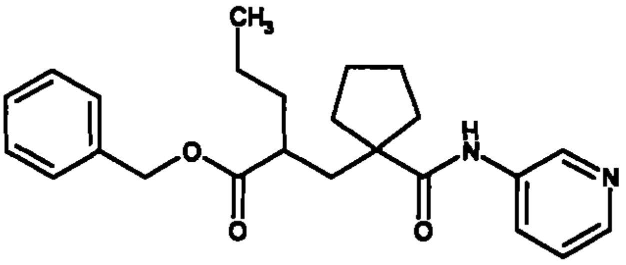
### Benzyl 2-{[1-(chlorocarbonyl)cyclopentyl]methyl}pentanoate



Oxalyl chloride (1.15ml, 13.2mmol) was added to an ice-cooled solution of 1-{2-[(benzyloxy)carbonyl]pentyl}cyclopentanecarboxylic acid (EP 274234) (2.0g, 6.3mmol) in dry dichloromethane (20ml), and the solution stirred at room temperature for 2 hours. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue azeotroped with dichloromethane (3x), to give the title compound as a golden oil, 2.1g; $^1$H NMR (CDCl$_3$, 300MHz) d: 0.88 (t, 3H), 1.28 (m, 2H), 1.43 (m, 2H), 1.63 (m, 6H), 2.00 (m, 1H), 2.08-2.35 (m, 3H), 2.44 (m, 1H), 5.15 (s, 2H), 7.28 (m, 5H).

## Preparation 12 (12/52)

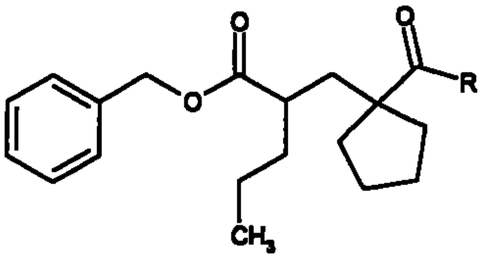
## Benzyl 2-({1-[(3-pyridinylamino)carbonyl]cyclopentyl}methyl)pentanoate



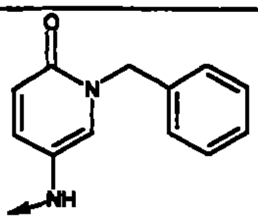
Triethylamine (0.11ml, 0.78mmol) was added to a mixture of the acid chloride from preparation 11 (11/3) (200mg, 0.60mmol) and 2-aminopyridine (61mg, 0.65mmol) in dichloromethane (3ml), and the reaction stirred at room temperature for 16 hours. The mixture was evaporated under reduced pressure, the residue partitioned between sodium bicarbonate solution (5ml) and ethyl acetate (20ml), and the layers separated. The organic phase was dried ($MgSO_4$), and evaporated under reduced pressure to give a gum. The crude product was purified by column chromatography on silica gel using ethyl acetate as eluant, to afford the title compound, 130mg; $^1H$ NMR ($CDCl_3$, 400MHz) d: 0.82 (t, 3H), 1.21 (m, 3H), 1.40 (m, 1H), 1.43-1.72 (m, 6H), 1.81 (d, 1H), 1.98 (m, 1H), 2.18 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 2.46 (m, 1H), 4.98 (m, 2H), 7.20-7.38 (m, 6H), 7.42 (s, 1H), 8.06 (d, 1H), 8.35 (d, 1H), 8.56 (s, 1H).

## Preparation 13 (13/56)

The following compound:



where:

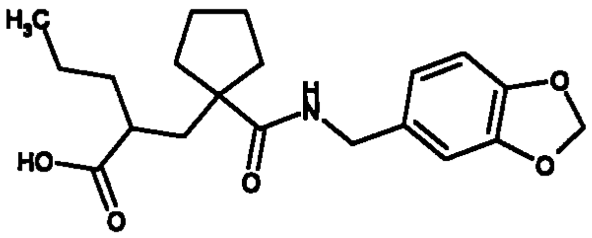
| Prep | R | Yield (%) | Data |
|---|---|---|---|
| 13 (13/56)[2] |  | 53 | $^1H$ NMR ($CDCl_3$, 300MHz) δ: 0.84 (t, 3H), 1.25 (m, 2H), 1.27-1.99 (m, 10H), 2.07-2.30 (m, 2H), 2.47 (m, 1H), 4.99 (s, 2H), 5.10 (dd, 2H), 6.59 (d, 1H), 7.15 (d, 1H), 7.34 (m, 11H), 8.10 (s, 1H). |

2 = N-methylmorpholine was used as the base

was prepared from the acid chloride from preparation 11 (11/3) and the appropriate amine, following a similar procedure to that described in preparation 12 (12/52).

**Preparation 14 (14/ex 1)**

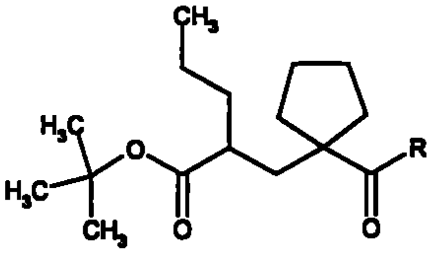
**2-({1-[(1,3-Benzodioxol-5-ylamino)carbonyl]cyclopentyl}methyl)pentanoic acid**



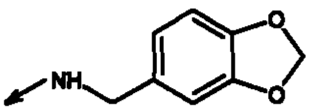
Trifluoroacetic acid (5ml) was added to a solution of the tert-butyl ester from preparation 15 (15/34) (130mg, 0.31mmol) in dichloromethane (5ml), and the solution stirred at room temperature for 4 hours. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue azeotroped with toluene and dichloromethane to afford the title compound as a clear oil, 112 mg, $^1$H NMR (CDCl$_3$, 400MHz) δ 0.83 (t, 3H), 1.22-1.40 (m, 3H), 1.50-1.72 (m, 8H), 1.95 (m, 1H), 2.10 (m, 2H), 2.19 (m, 1H), 4.30 (m, 2H), 5.93 (s, 2H), 5.99 (bs, 1H), 6.74 (m, 3H); LRMS: m/z 380 (MH$^-$).

**Preparation 15 (15/34)**

The following compound:



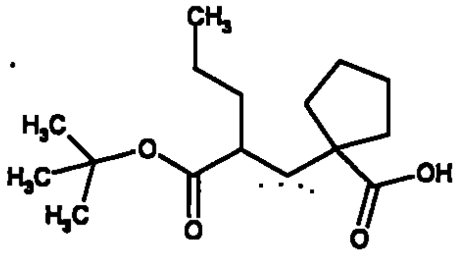
where

| Prep | R | Starting amine | Yield (%) | Data |
|---|---|---|---|---|
| 15 (15/34) |  | Piperonylamine | 88 | $^1$H NMR (CDCl$_3$, 400MHz) δ: 0.85 (t, 3H), 1.26 (m, 4H), 1.42 (s, 9H), 1.46 (m, 2H), 1.59-1.75 (m, 5H), 1.95 (m, 2H), 2.06 (m, 1H), 2.22 (m, 1H), 4.26 (dd, 1H), 4.39 (dd, 1H), 5.95 (m, 3H), 6.78 (m, 3H). LRMS : m/z 418.3 (MH$^+$) |

was prepared from the acid from preparation 16 (16/1) and the appropriate amine compound, following a similar procedure to that described in preparation 17 (17/33).

## Preparation 16 (16/1)

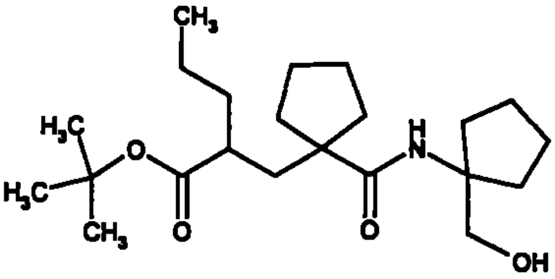
## 1-[2-(tert-Butoxycarbonyl)-4-pentyl]-cyclopentane carboxylic acid



A mixture of 1-[2-(tert-butoxycarbonyl)-4-pentenyl]-cyclopentane carboxylic acid (EP 274234) (23g, 81.5mmol) and 10% palladium on charcoal (2g) in dry ethanol (200ml) was hydrogenated at 30psi and room temperature for 18 hours. The reaction mixture was filtered through Arbocel®, and the filtrate evaporated under reduced pressure to give a yellow oil. The crude product was purified by column chromatography on silica gel, using ethyl acetate:pentane (40:60) as the eluant, to provide the desired product as a clear oil, 21g, 91%; $^1$H NMR (CDCl$_3$, 0.86 (t, 3H), 1.22-1.58 (m, 15H), 1.64 (m, 4H), 1.78 (dd, 1H), 2.00-2.18 (m, 3H), 2.24 (m, 1H); LRMS : m/z 283 (M-H)$^-$

## Preparation 17 (17/33)

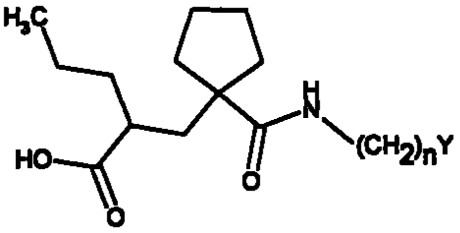
## tert-Butyl 2-{[1-({[1-(hydroxymethyl)cyclopentyl]amino}carbonyl)-cyclopentyl]methyl}pentanoate



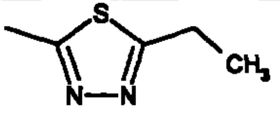
1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (41mg, 0.21mmol), 1-hydroxybenzotriazole hydrate (27mg, 0.2mmol), N-methylmorpholine (35µl, 0.31mmol) and finally 1-amino-1-cyclopentanemethanol (25mg, 0.22mmol) were added to a solution of the acid from preparation 16 (16/1) (150mg, 0.53mmol) in N,N-dimethylformamide (3ml), and the reaction stirred at 90°C for 18 hours. The cooled solution was diluted with ethyl acetate (90ml), washed with water (3x25ml), and brine (25ml), then dried ($MgSO_4$) and evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by chromatography on silica gel, using ethyl acetate:pentane (30:70) as the eluant to afford the title compound, 38mg, 57%; $^1H$ NMR ($CDCl_3$, 400MHz) d: 0.88 (t, 3H), 1.29 (m, 3H), 1.41-1.78 (m, 26H), 1.78-1.98 (m, 4H), 2.04 (m, 1H), 2.26 (m, 1H), 3.59 (dd, 1H), 3.70 (dd, 1H), 4.80 (t, 1H), 5.81 (s, 1H); LRMS : m/z 380 ($MH^+$).

## Preparation 18 (18/ex.4)

A compound of the formula shown below was prepared from the corresponding *tert*-butyl ester following a similar procedure to that described in Preparation 14 (14/ex.1).



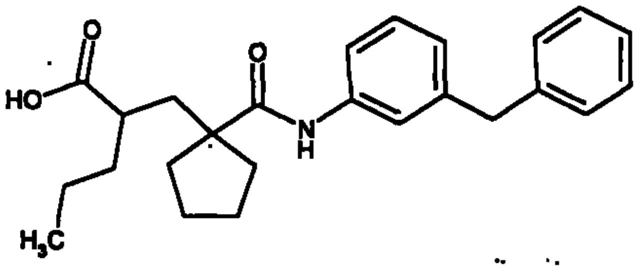
(Ic)

| Ex | N | R | Yield | Data |
|---|---|---|---|---|
| 18 (18/ex.4)[3] | 0 |  | 86 | $^1$H NMR (CDCl$_3$, 400MHz) δ: 0.92 (t, 3H), 1.35 (t, 3H), 1.25-1.80 (m, 11H), 2.20-2.50 (m, 4H), 2.95 (q, 2H), 12.10 (bs, 1H).<br>LRMS : m/z 339.8 (MH$^+$)<br>Anal. Found: C, 56.46; H, 7.46; N, 12.36. $C_{16}H_{25}N_3O_3S$ requires C, 56.62; H, 7.44; N, 12.37%. |

3 = recrystallised from ether

## Preparation 19 (19/ex.21)

2-({1-[(3-Benzylanilino)carbonyl]cyclopentyl}methyl)pentanoic acid



A mixture of the benzyl ester from preparation 10 (10/53) (1.3mg, 2.47mmol) and 5% palladium on charcoal (130mg) in water (10ml) and ethanol (40ml) was hydrogenated at 30 psi and room temperature for 2 hours. The reaction mixture was fiiltered through Arbocel®, the filtrate concentrated under reduced pressure, and the residue triturated with dichloromethane. The residual gum was triturated with ether, then hexane, and dried at 50°C, to give the title compound as a solid, 0.79g, 81%; $^1$H NMR (CDCl$_3$, 300MHz) δ: 0.95 (t, 3H), 1.24-1.51 (m, 3H), 1.58-1.80 (m, 7H), 1.88 (dd, 1H), 2.15 (m, 2H), 2.24 (m, 1H), 2.48 (m, 1H), 4.00 (s, 2H), 6.98 (d, 1H), 7.24 (m, 6H), 7.40 (m, 3H); Anal. Found: C, 75.48; H, 7.76; N, 3.59. $C_{25}H_{31}NO_3;0.25H_2O$ requires C, 75.44; H, 7.98; N, 3.51%.

## ACE ASSAY

## THE PREPARATION AND ASSAY OF SOLUBLE ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE), FROM PORCINE AND HUMAN KIDNEY CORTEX.

Soluble ACE activity is obtained from the kidney cortex and assayed by measuring the rate of cleavage of the ACE substrate Abz-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH to generate its fluorescent product, Abz-Gly.

### 1. MATERIALS

All water is double de ionised.

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 | Human Kidney | IIAM (Pennsylvania. U.S.A.) or UK Human Tissue Bank (UK HTB) |
| 1.2 | Porcine kidney ACE | Sigma (A2580) |

1.3 Homogenisation buffer-1

100mM Mannitol and 20mM Tris @ pH 7.1

2.42g Tris (Fisher T/P630/60) is diluted in 1 litre of water and the pH adjusted to 7.1 using 6M HCl at room temperature. To this 18.22g Mannitol (Sigma M-9546) is added.

1.4 Homogenisation buffer-2

100mM Mannitol, 20mM Tris @ pH7.1 and 10mM $MgCl_2 6H_2O$ (Fisher M0600/53)

To 500ml of the homogenisation buffer 1 (1.4) 1.017g of $MgCl_2$ is added.

1.5 Tris buffer (ACE buffer).

50mM Tris and 300mM NaCl @ pH 7.4

50ml of 50mM Tris pH 7.4 (Sigma T2663) and 17.52g NaCl (Fisher S/3160/60) are made up to 1000ml in water.

1.6 Substrate (Abz-D-Gly-p-nitro-Phe-Pro-OH) (Bachem M-1100)

ACE substrate is stored as a powder at –20°C. A 2mM stock is made by gently re-suspending the substrate in ACE buffer, this must not be vortexed or sonicated. 400µl aliquots of the 2mM stock are stored at –20°C for up to one month.

1.7 Total product

Samples corresponding to 100% substrate to product conversion are included on the plate to enable the % substrate turnover to be determined (see calculations). The total product is generated by incubating 1ml of 2mM substrate with 20µl of enzyme stock for 24 hours at 37°C.

1.8 Stop solution.

2097

0.5M EDTA (Promega CAS[6081/92/6]) is diluted 1:250 in ACE buffer to make a 2mM solution.

1.9 Dimethyl sulphoxide (DMSO).

1.10 Magnesium Chloride -$MgCl_2.6H_2O$ (Fisher M0600/53).

1.11 Black 96 well flat bottom assay plates (Costar 3915 or Packard).

1.12 Topseal A (Packard 6005185).

1.13 Centrifuge tubes

## 2. SPECIFIC EQUIPTMENT

2.1 Sorvall RC-5B centrifuge (SS34 GSA rotor, pre-cooled to 4°C).

2.2 Braun miniprimer mixer.

2.3 Beckman CS-6R centrifuge.

2.4 BMG Fluostar Galaxy.

2.5 Wesbart 1589 shaking incubator.

## 3. METHODS

### 3.1 TISSUE PREPARATION

3.3 Human ACE is obtained from the kidney cortex using a method adapted from Booth, A.G. & Kenny, A.J. (1974) *Biochem. J.* 142, 575-581.

3.3 Frozen kidneys are allowed to thaw at room temperature and the cortex is dissected away from the medulla.

3.4 The cortex is finely chopped and homogenised in approximately 10 volumes of homogenisation buffer-1 (1.4) using a Braun miniprimer (2.2).

3.5 Magnesium chloride (1.11) (20.3mg/gm tissue) is added to the homogenate and stirred in an ice-water bath for 15 minutes.

3.6 The homogenate is centrifuged at 1,500g (3,820rpm) for 12 minutes in a Beckman centrifuge (2.3) before removing the supernatant to a fresh centrifuge tube and discarding the pellet.

3.7 The supernatant is centrifuged at 15,000g (12,100rpm) for 12 minutes in a Sovall centrifuge (2.1) and the supernatant is discarded.

3.8 The pale pink layer on the top of the remaining pellet is removed and re-suspended in homogenisation buffer-2 (1.5) (5ml buffer per 1g tissue).

3.9 The suspension is centrifuged at 2,200g (4,630rpm) for 12 minutes in a Beckman centrifuge before discarding the pellet.

3.10 The supernatant is centrifuged at 15,000g (12,100rpm) for 12 minutes using the Sorvall centrifuge and the supernatant is discarded.

3.11 The final pellet is resuspended in homogenisation buffer-2 (0.5ml buffer per 1g tissue). A homogenous suspension is obtained using a Braun miniprimer. This is then frozen down in 100µl aliquots to be assayed for NEP activity.

## 4.0 DETERMINATION OF ACE ACTIVITY

The activity of the previously aliquoted ACE is measured by its ability to cleave the ACE specific peptide substrate.

Porcine ACE (1.2) is defrosted and resuspended in ACE buffer (1.6) at 0.004U/µl, this is frozen down in 50µl aliquots.

4.1 A 4% DMSO/ACE buffer solution is made (4mls DMSO in 96mls ACE buffer).

4.2 Substrate (1.7), total product (1.8) and enzyme (1.1, 1.2, 1.3), are left on ice to thaw.

4.3 50µl of 4% DMSO/ACE buffer solution is added to each well.

4.4 The 2mM substrate stock is diluted 1:100 to make a 20µM solution. 100µl of 20µM substrate is added to each well (final concentration in the assay 10µM).

4.5 50µl of a range of enzyme dilutions is added to initiate the reaction (usually 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, and 1:3200 are used). 50µl of ACE buffer is added to blank wells.

4.6 The 2mM total product is diluted 1:200 to make 10µM solution. 200µl 10µM product is added to the first four wells of a new plate.

4.7 Plates are incubated at 37°C in a shaking incubator for 60 minutes.

4.8 The enzyme reaction is stopped by the addition of 100µl 2mM EDTA in ACE buffer and incubated at 37°C in a shaking incubator for 20 minutes before being read on the BMG Fluostar Galaxy (ex320/em420).

## 5. ACE INHIBITION ASSAYS

5.1 Substrate, total product, and enzyme stocks are left on ice to thaw.

5.2 Compound stocks are made up in 100% DMSO and diluted 1:25 in ACE buffer to give a 4% DMSO solution. All further dilutions are carried out in a 4% DMSO/ACE buffer solution (4mls DMSO in 96mls ACE buffer).

5.3 50µl of compound, in duplicate, is added to the 96 well plate and 50µl of 4% DMSO/ACE buffer is added to control and blank wells.

5.4 Steps 5.2 and 5.3 can be carried out either by hand or using the Packard multiprobe robots

5.5 The 2mM substrate stock is diluted 1:100 in ACE buffer to make a 20μM solution (10μM final concentration in the assay) (110μl of 2mM substrate added to 10.89ml buffer is enough for 1 plate).

5.6 The enzyme stock is diluted in ACE buffer, as determined from activity checks (4.0).

5.7 The 2mM total product stock is diluted 1:200 in ACE buffer to make a 10μM solution. 200μl is added to the first four wells of a separate plate.

5.8 The 0.5mM EDTA stock is diluted 1:250 to make a 2mM stock (44μl EDTA to 10.96ml ACE buffer).

5.9 To each well of the 96 well plate the following reagents are added:

Table 1: Reagents added to 96 well plate.

|  | Compound/ DMSO | Tris Buffer | Substrate | ACE enzyme | Total product |
|---|---|---|---|---|---|
| Samples | 2μl compound | 50μl | 100μl | 50μl | None |
| Controls | 2μl DMSO | 50μl | 100μl | 50μl | None |
| Blanks | 2μl DMSO | 100μl | 100μl | None | None |
| Totals | 2μl DMSO | None | None | None | 200μl |

5.10 50μl of the highest concentration of each compound used in the assay is added in duplicate to the same 96 well plate as the totals (5.7). 150μl of ACE buffer is added to determine any compound fluorescence.

5.11 The reaction is initiated by the addition of the ACE enzyme before incubating at 37°C for 1 hour in a shaking incubator.

5.12 The reaction is stopped by the addition of 100μl 2mM EDTA and incubated at 37°C for 20 minutes in a shaking incubator, before being read on the BMG Fluostar Galaxy (ex320/em420).

## 6. CALCULATIONS

The activity of the ACE enzyme is determined in the presence and absence of compound and expressed as a percentage.

FU = Fluorescence units

(i) % Control activity (turnover of enzyme):

$$\frac{\text{Mean FU of controls} - \text{Mean FU of blanks}}{\text{Mean FU of totals} - \text{Mean FU of blanks}} \text{ X } 100$$

(ii) % Activity with inhibitor:

$$\frac{\text{Mean FU of compound} - \text{Mean FU of blanks}}{\text{Mean FU of totals} - \text{Mean FU of blanks}} \text{ X } 100$$

(iii) Activity expressed as % of control:

$$\frac{\text{\% Activity with inhibitor}}{\text{\% Control activity}} \text{ X } 100$$

OR

$$\frac{\text{Mean FU of compound} - \text{Mean FU of blanks}}{\text{Mean FU of controls} - \text{Mean FU of blanks}} \text{ X } 100$$

(iv) % Inhibition = 100 - % control

(v) For fluorescent compounds the mean FU of blanks containing compound (5.10) is deducted from the mean FU of compound values used to calculate the % Activity.

A sigmoidal dose-response curve is fitted to the % activities (% of control) vs compound concentration and $IC_{50}$ values calculated using LabStats fit-curve in Excel.

## CONCLUSIONS

We have developed an animal model that reflects the physiological arousal response observed during female sexual arousal and directly reflects the clinical data obtained in human volunteers. The model uses Laser Doppler technologies to record small changes in vaginal and clitoral blood flow induced by pelvic nerve stimulation or vasoactive neurotransmitters. During sexual arousal, there is an increase in genital blood flow resulting from increased innervation from the pelvic nerve. The pelvic nerve-stimulated increase in vaginal and clitoral blood flow, observed in the animal model, represents the endogenous vascular effects observed during female sexual arousal – i.e. engorgement. Therefore this model can be used to firstly, identify the mechanisms involved in the regulation of vaginal and clitoral blood flow and secondly, to validate novel approaches for the enhancement of genital blood flow.

This study has successfully used a combination of *in vivo*, *in vitro* and biochemical techniques to show that VIP mediates genital blood flow and to identify cAMP as the mediator/second messenger regulating genital vasorelaxation (and vaginal wall relaxation). Using this animal model we have demonstrated that infusion fusion of VIP induces increases in vaginal and clitoral blood flow. Using an inhibitor of VIP metabolism (e.g. a NEP EC3.4.24.11 inhibitor), we have also demonstrated that the increases in genital blood flow observed during pelvic nerve stimulation (ie sexual arousal) is mediated by VIP. We have shown that VIP-mediated increases in genital blood flow result from elevation of tissue cAMP, whereas previously VIP had been shown to increase vaginal blood flow in healthy volunteers but the cellular mechanism was not identified. Additionally, we have demonstrated that genital blood flow can be enhanced directly with a cAMPmimetic or indirectly by elevating cAMP concentrations with a $PDE_{cAMP}$ type 2 inhibitor or an NPY Y1 receptor antagonist.

The major cause of FSAD is decreased genital blood flow and this manifests itself as reduced vaginal, labial and clitoral engorgement. Treatment of women with FSAD is achievable by restoration of the *normal* sexual arousal response. This can be achieved by enhancing genital blood flow. Our approach for the treatment of FSAD will be to enhance genital blood flow thereby potentiating vaginal engorgement/lubrication and clitoral engorgement/sensitivity by either directly or indirectly potentiating endogenous cAMP signalling eg with an inhibitor of NEP (EC 3.4.24.11), a cAMP-hydrolysing PDE inhibitor or a NPY receptor antagonist. This will have the overall effect of restoring or potentiating the *normal* arousal response with no cardiovascular side effects. Sexual arousal/engorgement will be enhanced, rather than simply being induced in the absence of sexual drive, which may be the case with some exogenously administered vasoactive agents eg VIP.

In summary therefore, the present invention relates to *inter alia*:

A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, preferably FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, preferably FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD.

A method of treating a female (such as a female suffering from FSD, preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

For these embodiments, preferably the agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

In a highly preferred embodiment, the present invention relates to *inter alia*:

A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, preferably FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is delivered orally.

Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, preferably FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the

2100

sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; and wherein said agent is delivered orally.

A method of treating a female (such as a female suffering from FSD, preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is delivered orally.

For these embodiments, preferably the agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

In an additional highly preferred embodiment, the present invention relates to *inter alia*:

A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, preferably FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent potentiates endogenous cAMP.

Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, preferably FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; and wherein said agent potentiates endogenous cAMP.

A method of treating a female (such as a female suffering from FSD, preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent potentiates endogenous cAMP.

For these embodiments, preferably the agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

In a further highly preferred embodiment, the present invention relates to *inter alia*:

A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, preferably FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is delivered orally and wherein said agent potentiates endogenous cAMP.

Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, preferably FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; and wherein said agent is delivered orally and wherein said agent potentiates endogenous cAMP.

A method of treating a female (such as a female suffering from FSD, preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is delivered orally and wherein said agent potentiates endogenous cAMP.

For these embodiments, preferably the agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

2101

All publications mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described methods and system of the present invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the present invention. Although the present invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in biochemistry and biotechnology or related fields are intended to be within the scope of the following claims.

## GENERAL TEXT REFERENCES

Ashur-Fabian, O., Perl ,O., Lilling, G., *et al.* (1999). SNV, a lipophilic superactive VIP analog, acts through cGMP to promote neuronal survival. *Peptides*, **20**, 629-633.

Berman, J.R., Berman, L. & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: Incidence, pathophysiology, evaluation, and treatment options. *Urology*, **54**, 385-391.

Berman, J., Goldstein, I., Werbin, T. *et al.* (1999a). Double blind placebo controlled study with crossover to assess effect of sildenafil on physiological parameters of the female sexual response. *J. Urol.*, **161**, 805.

Burnett, A, Calvin, D., Silver, R. *et al.* (1997). Immunohistochemical description of nitric oxide synthase isoforms in human clitoris. *J. Urol.*, **158**, 75-78.

*Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV*, American Psychiatric Association: Washington, DC., 1987, pp 493-518.

Fan, Y.P., Chakder, S. & Ratton, S. (1998). Inhibitory effect of zinc protoporphyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal polypeptide and other receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 468-474.

Foda, H.D., Sharaf, H.H., Absood, A. *et al.* (1995). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides*, **16**, 1057-1061.

Frank, E., Anderson, C. & Rubinstein, D. (1978). Frequency of sexual dysfunction in "normal" couples. *N. Engl. J. Med.*, **229**, 111-115.

Goldstein, I. & Berman, J.R. (1998). Vasculogenic female sexual dysfunction: vaginal engorgement and clitoral erectile insufficiency syndromes. *Int. J. Impot. Res.*, **10**, S84-S90.

Gu, Z.F., Jensen, R.T. & Maton, P.N. (1992). A primary role for protein kinase A in smooth muscle relaxation induced by adrenergic agonists and neuropeptides. *Am. J. Physiol.*, **263**, G360-G364.

2102

Hauser-Kronberger, C., Cheung, A., Hacker, G. *et al.* (1999). Peptidergic innervation of the human clitoris. *Peptides*, **20**, 539-543.

Hoyle, C.H.V., Stones, R.W., Robson, T. *et al.* (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide containing nerves. *J. Anat.*, **188**, 633-644.

Ingenhoven, N. & Beck-Sickinger, A.G. (1997). Flourescent labelled analogues of neuropeptide Y for the characterisation of cells expressing NPY receptor subtypes. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 17, 407-418.

Jovanovic, A., Jovanovic, S., Tulic,. I. *et al.* (1998). Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Human Reprod.*, **4**, 71-76.

Kaplan, H.S. (1974). The New Sex Therapy. London, Bailliere Tindall.

Kaplan, S.A., Reis, R.B., Kohm, I.J. *et al.* (1999). Safety and efficacy of sildenafil in postmenopausal women with sexual dysfunction. *Urology*, **53**, 481-486.

Kim, Y.C., Choi, H.K., Ahn, Y.S., *et al.* (1994). The effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on rabbit cavernosal smooth muscle contractility. *J. Androl.*, **15**, 392-739.

Laan, E. & Everaerd, W. (1998). Physiological measures of vaginal vasocongestion. *Int. J. Impot. Res.*, **10**, S107-S110.

Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, **10**, S104-S106.

Levin, R.J. (1980). The physiology of sexual function in women. *Clin. Obstet. Gynecol.*, **7**, 213-252.

Levin, R.J. (1991). VIP, vagina, clitoral and preurethral glans: An update on female genital arousal. *Exp. Clin. Endocrinol.*, **98**, 61-69.

Levin, R.J. (1992). The mechanisms of human female sexual arousal. *Ann. Rev. Sex Res.*, **3**, 1-48.

Levin, R.J. & Wagner, G. (1986). TRH and vaginal blood flow-effects in concious women and anaesthetised sheep. *J. Physiol.*, **373**, 83P.

Lundberg, J.M., Modin, A. & Malmstrom, R.E. (1996). Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **17**, 301-304.

Masters, W.H., Johnson, V.E. *Human Sexual Response*. Little, Brown: Boston, 1996.

Ottesen, B., Gerstenberg, T., Ulrichsen, H. *et al.* (1983). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases vaginal blood flow and inhibits smooth muscle activity in women. *Eur. J. Clin. Invest.*, **13**, 321-324.

Ottesen, B., Wagner, G. & Fahrenkrug, J. *Peptide innervation of the sexual organs.* In: Handbook of Sexology, Vol. 6, The Pharmacological and Endocrinology of Sexual Function, Sitsen, J.M.A. (eds), Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1988), chapter 4, pp 66-97.

Ottensen, B., Pedersen, B., Nielsen, J. *et al.* (1987). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides*, **8**, 797-800.

Park, K., Goldstein, I., Andry, C., *et al.* (1997). Vasculogenic female sexual dysfunction: The hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency. *Int. J. Impotence Res.*, **9**, 27-37.

Rosen, R., Taylor, J., Leiblum, S. *et al.* (1993). Prevalence of sexual dysfunction in women: results of a survey of 329 women in an outpatient gynecological clinic. *J. Sex Marital Ther.*, **19**, 171-188.

Schiavi, R.C. & Seagraves, R.T. (1995). The biology of sexual function. *Psychiat. Clin. North. Am.*, **18**, 7-23.

2103

Schoeffter, P. & Stoclet, J.C. (1985). Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, **109**, 275-279.

Serradeil-Le Gal, C., Valette, G., Rouby, P.E. *et al.* (1995). SR 120819A, an orally-active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Letters*, **3**, 192-196.

Sjoberg, I. (1992). The vagina: Morphological, functional and ecological aspects. *Acta Obst. Gynecol. Scand.*, **71**, 84-85.

Spector, I.P. & Carey, M.P. (1990). Incidence and prevalence of sexual dysfunctions: a critical review of the empirical literature. *Arch. Sex. Behav.*, **19**, 389-408.

Wagner, G. (1992). Aspects of genital physiology and pathology. *Sem. Neurol.*, **12**, 87-97.

Werbin, T., Salimpour, P., Berman, L., et al. (1999). Effect of sexual stimulation and age on genital blood flow in women with sexual stimulation. *J. Urol.*, **161**, 688

Wincze, J.P., Albert, A. & Bansal, S. (1993). Sexual arousal in diabetic females: Physiological and self-report measures. *Arch. Sex Behav.*, **22**, 587-601.

Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M. *et al.* (1995). Subtype selectivity and antagonist profile of the nonpeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J Pharmacol Exp Ther.*, **275**, 143-9.

## REFERENCES FOR THE PDE SECTION

Han, P.; Fletcher, C. F.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Yaremko, L. M.; Michaeli, T. : Assignment of the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3 and of the human PDE7A gene to chromosome 8q13. Genomics 48: 275-276, 1998.

2. Michaeli, T.; Bloom, T. J.; Martins, T.; Loughney, K.; Ferguson, K.; Riggs, M.; Rodgers, L.; Beavo, J. A.; Wigler, M. : Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 268: 12925-12932, 1993.

3. Milatovich, A.; Bolger, G.; Michaeli, T.; Francke, U. : Chromosome localizations of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse. Somat. Cell Molec. Genet. 20: 75-86, 1994.

4. Rosman, G. J.; Martins, T. J.; Sonnenburg, W. K.; Beavo, J. A.; Ferguson, K.; Loughney, K. : Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3-prime,5-prime-cyclic nucleotide phosphodiesterase. Gene 191: 89-95, 1997.

## REFERENCES FOR THE NEP SECTION

1. Barker, P. E.; Shipp, M. A.; D'Adamio, L.; Masteller, E. L.; Reinherz, E. L. The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3(q21-q27). J. Immun. 142: 283-287, 1989.

2. D'Adamio, L.; Shipp, M. A.; Masteller, E. L.; Reinherz, E. L. : Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5-prime untranslated regions. Proc. Nat. Acad. Sci. 86: 7103-7107, 1989.

3. Letarte, M.; Vera, S.; Tran, R.; Addis, J. B. L.; Onizuka, R. J.; Quackenbush, E. J.; Jongeneel, C. V.; McInnes, R. R. : Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. J. Exp. Med. 168: 1247-1253, 1988.

4. Shipp, M. A.; Vijayaraghavan, J.; Schmidt, E. V.; Masteller, E. L.; D'Adamio, L.; Hersh, L. B.; Reinherz, E. L : Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ('enkephalinase'): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. 86: 297-301, 1989.

5. Tran-Paterson, R.; Willard, H. F.; Letarte, M. : The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase—3.4.24.11) gene is located on human chromosome 3. Cancer Genet. Cytogenet. 42: 129-134, 1989.

## REFERENCES FOR THE NPY SECTION

1. Allen, J. M.; Bloom, S. R. : Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8: 1-8, 1986.

2. Bahary, N.; Zorich, G.; Pachter, J. E.; Leibel, R. L.; Friedman, J. M. : Molecular genetic linkage maps of mouse chromosomes 4 and 6. Genomics 11: 33-47, 1991.

3. Baker, E.; Hort, Y. J.; Ball, H.; Sutherland, G. R.; Shine, J.; Herzog, H. : Assignment of the human neuropeptide Y gene to chromosome 7p15.1 by nonisotopic in situ hybridization. Genomics 26: 163-164, 1995.

5. Carr, L. G.; Foroud, T.; Bice, P.; Gobbett, T.; Ivashina, J.; Edenberg, H.; Lumeng, L.; Li, T. K. : A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. Alcohol Clin. Exp. Res. 22: 884-887, 1998.

5. Dockray, G. J. : Neuropeptide Y: in search of a function. Neurochem. Int. 8: 9-11, 1986.

6. Erickson, J. C.; Clegg, K. E.; Palmiter, R. D. : Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. Nature 381: 415-421, 1996. PubMed ID : 8632796

7. Erickson, J. C.; Hollopeter, G.; Palmiter, R. D. : Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274: 1704-1706, 1996.

8. Karvonen, M. K.; Pesonen, U.; Koulu, M.; Niskanen, L.; Laakso, M.; Rissanen, A.; Dekker, J. M.; 't Hart, L. M.; Valve, R.; Uusitupa, M. I. : Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. Nature Med. 4: 1434-1437, 1998.

9. Maccarrone, C.; Jarrott, B. : Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8: 13-22, 1986.

2105

10. Meisler, M. H.; Spence, J. E.; Dixon, J. E.; Caldwell, R. M.; Minth, C. D.; Beaudet, A. L. : Exclusion of close linkage between the loci for cystic fibrosis and neuropeptide Y on human chromosome 7. Cytogenet. Cell Genet. 44: 175-176, 1987.

11. Minth, C. D.; Andrews, P. C.; Dixon, J. E. : Characterization, sequence, and expression of the cloned human neuropeptide Y gene. J. Biol. Chem. 261: 11974-11979, 1986.

12. Minth, C. D.; Bloom, S. R.; Polak, J. M.; Dixon, J. E. : Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine. Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 4577-4581, 1984.

13. Takeuchi, T.; Gumucio, D.; Eddy, R.; Meisler, M.; Minth, C.; Dixon, J.; Yamada, T.; Shows, T. : Assignment of the related pancreatic polypeptide (PPY) and neuropeptide Y (NPY) genes to regions on human chromosomes 17 and 7. (Abstract) Cytogenet. Cell Genet. 40: 759 only, 1985.

14. Takeuchi, T.; Gumucio, D. L.; Yamada, T.; Meisler, M. H.; Minth, C. D.; Dixon, J. E.; Eddy, R. E.; Shows, T. B. : Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. J. Clin. Invest. 77: 1038-1041, 1986.

15. Terenghi, G.; Polak, J. M.; Hamid, Q.; O'Brien, E.; Denny, P.; Legon, S.; Dixon, J.; Minth, C. D.; Palay, S. L.; Yasargil, G.; Chan-Palay, V. : Localization of neuropeptide Y mRNA in neurons of human cerebral cortex by means of in situ hybridization with a complementary RNA probe. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 7315-7318, 1987.

16. Thiele, T. E.; Marsh, D. J.; Ste. Marie, L.; Bernstein, I. L.; Palmiter, R. D. : Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. Nature 396: 366-369, 1998.

17. Uusitupa, M. I. J.; Karvonen, M. K.; Pesonen, U.; Koulu, M. : Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism. Ann. Med. 30: 508-510, 1998.

## REFERENCES FOR THE NPYR1 SECTION

1. Herzog, H.; Baumgartner, M.; Vivero, C.; Selbie, L. A.; Auer, B.; Shine, J. : Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor. J. Biol. Chem. 268: 6703-6707, 1993.

2. Herzog, H.; Darby, K.; Ball, H.; Hort, Y.; Beck-Sickinger, A.; Shine, J. : Overlapping gene structure of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests coordinate transcriptional regulation. Genomics 41: 315-319, 1997.

3. Herzog, H.; Hort, Y. J.; Ball, H. J.; Hayes, G.; Shine, J.; Selbie, L. A. : Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. Proc. Nat. Acad. Sci. 89: 5794-5798, 1992.

4. Larhammar, D.; Blomqvist, A. G.; Yee, F.; Jazin, E.; Yoo, H.; Wahlestedt, C. : Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. J. Biol. Chem. 267: 10935-10938, 1992.

5. Lutz, C. M.; Frankel, W. N.; Richards, J. E.; Thompson, D. A. : Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

2106

## REFERENCES FOR THE NPYR2 SECTION

1. Ammar, D. A.; Eadie, D. M.; Wong, D. J.; Ma, Y.-Y.; Kolakowski, L. F., Jr.; Yang-Feng, T. L.; Thompson, D. A. : Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide Y receptor gene. Genomics 38: 392-398, 1996.

2. Gerald, C.; Walker, M. W.; Vaysse, P. J.-J.; He, C.; Branchek, T. A.; Weinshank, R. L. : Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. J. Biol. Chem. 270: 26758-26761, 1995.

3. Lutz, C. M.; Frankel, W. N.; Richards, J. E.; Thompson, D. A. : Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

4. Rose, P. M.; Fernandes, P.; Lynch, J. S.; Frazier, S. T.; Fisher, S. M.; Kodukula, K.; Kienzle, B.; Seethala, R. : Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. J. Biol. Chem. 270: 22661-22664, 1995.

## REFERENCES FOR THE VIP SECTION

1. Bodner, M.; Fridkin, M.; Gozes, I. : Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3548-3551, 1985.

2. Gotoh, E.; Yamagami, T.; Yamamoto, H.; Okamoto, H. : Chromosomal assignment of human VIP/PHM-27 gene to 6q26-q27 region by spot blot hybridization and in situ hybridization. Biochem. Int. 17: 555-562, 1988.

3. Gozes, I.; Avidor, R.; Yahav, Y.; Katznelson, D.; Croce, C. M.; Huebner, K. : The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21-6qter. Hum. Genet. 75: 41-44, 1987.

4. Gozes, I.; Nakai, H.; Byers, M.; Avidor, R.; Weinstein, Y.; Shani, Y.; Shows, T. B. : Sequential expression in the nervous system of C-MYB and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24. Somat. Cell Molec. Genet. 13: 305-313, 1987.

5. Heinz-Erian, P.; Dey, R. D.; Flux, M.; Said, S. I. : Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. Science 229: 1407-1408, 1985.

6. Itoh, N.; Obata, K.; Yanaihara, N.; Okamoto, H. : Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature 304: 547-549, 1983.

7. Linder, S.; Barkhem, T.; Norberg, A.; Persson, H.; Schalling, M.; Hokfelt, T.; Magnusson, G. : Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 605-609, 1987.

8. Omary, M. B.; Kagnoff, M. F. : Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line. Science 238: 1578-1581, 1987.

## REFERENCES FOR THE AC SECTION

1. Parma, J.; Stengel, D.; Gannage, M.-H.; Poyard, M.; Barouki, R.; Hanoune, J. : Sequence of a human brain adenylyl cyclase partial cDNA: evidence for a consensus cyclase domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 455-462, 1991.

2. Stengel, D.; Parma, J.; Gannage, M.-H.; Roeckel, N.; Mattei, M.-G.; barouki, R.; Hanoune, J. : Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. Hum. Genet. 90: 126-130, 1992.

## REFERENCES FOR THE VPAC1 SECTION

1. Couvineau, A.; Rouyer-Fessard, C.; Darmoul, D.; Maoret, J.-J.; Carrero, I.; Ogier-Denis, E.; Laburthe, M. : Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains. Biochem. Biophys. Res. Commun. 200: 769-776, 1994.

2. Hashimoto, H.; Nishino, A.; Shintani, N.; Hagihara, N.; Copeland, N. G.; Jenkins, N. A.; Yamamoto, K.; Matsuda, T.; Ishihara, T.; Nagata, S.; Baba, A. : Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VPAC-1) receptor. Genomics 58: 90-93, 1999.

3. Libert, F.; Passage, E.; Parmentier, M.; Simons, M.-J.; Vassart, G.; Mattei, M.-G. : Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonin receptor. Genomics 11: 225-227, 1991.

4. Sreedharan, S. P.; Huang, J.-X.; Cheung, M.-C.; Goetzl, E. J. : Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. Proc. Nat. Acad. Sci. 92: 2939-2943, 1995.

5. Sreedharan, S. P.; Patel, D. R.; Huang, J.-X.; Goetzl, E. J. : Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193: 546-553, 1993.

6. Sreedharan, S. P.; Robichon, A.; Peterson, K. E.; Goetzl, E. J. : Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. 88: 4986-4990, 1991.

7. Vassart, G. : Personal Communication. Brussels, Belgium, 1/15/1992. 8. Wenger, G. D. : Personal Communication. Columbus, Ohio, 8/3/1993.

2108

REFERENCES FOR THE VPAC2 SECTION

1. Adamou, J. E.; Aiyar, N.; Van Horn, S.; Elshourbagy, N. A. : Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commmun. 209: 385-392, 1995.

2. Mackay, M.; Fantes, J.; Scherer, S.; Boyle, S.; West, K.; Tsui, L.-C.; Belloni, E.; Lutz, E.; Van Heyningen, V.; Harmar, A. J. : Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. Genomics 37: 345-353, 1996.

3. Svoboda, M.; Tastenoy, M.; Van Rampelbergh, J.; Goossens, J.-F.; De Neef, P.; Waelbroeck, M.; Robberecht, P. : Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochem. Biophy. Res. Commun. 205: 1617-1624, 1994.

## SEQUENCE LISTINGS

### 1. NEP (EC 3.4.24.11)

```
LOCUS       HSMRNAEN     3181 bp    mRNA            PRI       12-SEP-1993
DEFINITION  Human mRNA for enkephalinase (EC 3.4.24.11).
ACCESSION   X07166
NID         g34757
VERSION     X07166.1  GI:34757
KEYWORDS    enkephalinase; metalloprotein; neutral endopeptidase.
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
            Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 3181)
  AUTHORS   Malfroy,B., Kuang,W.J., Seeburg,P.H., Mason,A.J. and Schofield,P.R.
  TITLE     Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase
            (neutral endopeptidase)
  JOURNAL   FEBS Lett. 229 (1), 206-210 (1988)
  MEDLINE   88152222
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..3181
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /tissue_type="placenta"
                     /clone_lib="lambda gt10"
                     /clone="lambda H7"
     CDS             18..2249
                     /note="enkephalinase (AA 1-743)"
                     /codon_start=1
                     /protein_id="CAA30157.1"
                     /db_xref="PID:g34758"
                     /db_xref="GI:34758"
                     /db_xref="SWISS-PROT:P08473"
                     /translation="MDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYAT
                     YDDGICKSSDCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKYACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDI
                     LRDELEVVLKDVLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINESAIDSRGGEPLLKLLPDIYGW
                     PVATENWEQKYGASWTAEKAIAQLNSKYGKKVLINLFVGTDDKNSVNHVIHIDQPRLG
                     LPSRDYYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDENQLALEMNKVMELEKEI
                     ANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSLEINGKPFSWLNFTNEIMSTVNISITNE
                     EDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTYKESRNAFRKALY
                     GTTSETATWRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDD
                     LTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNKLNNEYLELNYKEDEYFENIIQNL
                     KFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSL
                     NYGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSASNFKEQSQCMVYQYGNFSW
                     DLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLGQAYRAYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQLFFLN
                     FAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEKKC
                     RVW"
     misc_feature    3073..3078
                     /note="poly A signal"
```

2109 2110

```
BASE COUNT     1055 a    582 c    657 g    887 t
ORIGIN
        1 gcaagtcaga aagtcagatg gatataactg atatcaacac tccaaagcca aagaagaaac
       61 agcgatggac tccactggag atcagcctct cggtccttgt cctgctcctc accatcatag
      121 ctgtgacaat gatcgcactc tatgcaacct acgatgatgg tatttgcaag tcatcagact
      181 gcataaaatc agctgctcga ctgatccaaa acatggatgc caccactgag ccttgtacag
      241 actttttcaa atatgcttgc ggaggctggt tgaaacgtaa tgtcattccc gagaccagct
      301 cccgttacgg caactttgac attttaagag atgaactaga agtcgttttg aaagatgtcc
      361 ttcaagaacc caaaactgaa gatatagtag cagtgcagaa agcaaaagca ttgtacaggt
      421 cttgtataaa tgaatctgct attgatagca gaggtggaga acctctactc aaactgttac
      481 cagacatata tgggtggcca gtagcaacag aaaactggga gcaaaaatat ggtgcttctt
      541 ggacagctga aaaagctatt gcacaactga attctaaata tgggaaaaaa gtccttatta
      601 atttgtttgt tggcactgat gataagaatt ctgtgaatca tgtaattcat attgaccaac
      661 ctcgacttgg cctccccttct agagattact atgaatgcac tggaatctat aaagaggctt
      721 gtacagcata tgtggatttt atgatttctg tggccagatt gattcgtcag gaagaaagat
      781 tgcccatcga tgaaaaccag cttgctttgg aaatgaataa agttatggaa ttggaaaaag
      841 aaattgccaa tgctacggct aaacctgaag atcgaaatga tccaatgctt ctgtataaca
      901 agatgacatt ggcccagatc caaaataact tttcactaga gatcaatggg aagccattca
      961 gctggttgaa tttcacaaat gaaatcatgt caactgtgaa tattagtatt acaaatgagg
     1021 aagatgtggt tgtttatgct ccagaatatt taaccaaact taagcccatt cttaccaaat
     1081 attctgccag agatcttcaa aatttaatgt cctggagatt cataatggat cttgtaagca
     1141 gcctcagccg aacctacaag gagtccagaa atgctttccg caaggccctt tatggtacaa
     1201 cctcagaaac agcaacttgg agacgttgtg caaactatgt caatgggaat atggaaaatg
     1261 ctgtggggag gctttatgtg gaagcagcat ttgctggaga gagtaaacat gtggtcgagg
     1321 atttgattgc acagatccga gaagttttta ttcagacttt agatgacctc acttggatgg
     1381 atgccgagac aaaaaagaga gctgaagaaa aggccttagc aattaaagaa aggatcggct
     1441 atcctgatga cattgtttca aatgataaca aactgaataa tgagtacctc gagttgaact
     1501 acaaagaaga tgaatacttc gagaacataa ttcaaaattt gaaattcagc caaagtaaac
     1561 aactgaagaa gctccgagaa aaggtggaca aagatgagtg gataagtgga gcagctgtag
     1621 tcaatgcatt ttactcttca ggaagaaatc agatagtctt cccagccggc attctgcagc
     1681 ccccccttctt tagtgcccag cagtccaact cattgaacta tgggggcatc ggcatggtca
     1741 taggacacga aatcacccat ggcttcgatg acaatggcag aaactttaac aaagatggag
     1801 acctcgttga ctggtggact caacagtctg caagtaactt taaggagcaa tcccagtgca
     1861 tggtgtatca gtatggaaac ttttcctggg acctggcagg tggacagcac cttaatggaa
     1921 ttaatacact gggagaaaac attgctgata atggaggtct tggtcaagca tacagagcct
     1981 atcagaatta tattaaaaag aatggcgaag aaaaattact tcctggactt gacctaaatc
     2041 acaaacaact atttttcttg aactttgcac aggtgtggtg tggaacctat aggccagagt
     2101 atgcggttaa ctccattaaa acagatgtgc acagtccagg caatttcagg attattggga
     2161 ctttgcagaa ctctgcagag ttttcagaag cctttcactg ccgcaagaat tcatacatga
     2221 atccagaaaa gaagtgccgg gtttggtgat cttcaaaaga agcattgcag cccttggcta
     2281 gacttgccaa caccacagaa atggggaatt ctctaatcga aagaaaatgg gccctagggg
     2341 tcactgtact gacttgaggg tgattaacag agagggcacc atcacaatac agataacatt
     2401 aggttgtcct agaaagggtg tggagggagg aagggggtct aaggtctatc aagtcaatca
     2461 tttctcactg tgtacataat gcttaatttc taaagataat attactgttt atttctgttt
     2521 ctcatatggt ctaccagttt gctgatgtcc ctagaaaaca atgcaaaacc tttgaggtag
     2581 accaggattt ctaatcaaaa gggaaaagaa gatgttgaag aatacagtta ggcaccagaa
     2641 gaacagtagg tgacactata gtttaaaaca cattgcctaa ctactagttt ttacttttat
     2701 ttgcaacatt tacagtcctt caaaatcctt ccaaagaatt cttatacaca ttggggcctt
     2761 ggagcttaca tagttttaaa ctcatttttg ccatacatca gttattcatt ctgtgatcat
     2821 ttattttaag cactcttaaa gcaaaaaatg aatgtctaaa attgtttttt gttgtacctg
     2881 ctttgactga tgctgagatt cttcaggctt cctgcaattt tctaagcaat ttcttgctct
```

2941 atctctcaaa acttggtatt tttcagagat ttatataaat gtaaaaataa taatttttat
3001 atttaattat taactacatt tatgagtaac tattattata ggtaatcaat gaatattgaa
3061 gtttcagctt aaaataaaca gttgtgaacc aagatctata aagcgatata cagatgaaaa
3121 tttgagacta tttaaactta taaatcatat tgatgaaaag atttaagcac aaactttagg
3181 g

2110

## 2. PDE type 1

```
LOCUS       HSPDE1A3A    2008 bp    mRNA            PRI       12-APR-1996
DEFINITION  Human 3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase (HSPDE1A3A) mRNA,
            complete cds.
ACCESSION   U40370
NID         g1151108
VERSION     U40370.1  GI:1151108
KEYWORDS    calmodulin-stimulated phosphodiesterase.
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2008)
  AUTHORS   Loughney,K., Martins,T.J., Harris,E.A., Sadhu,K., Hicks,J.B.,
            Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A. and Ferguson,K.
  TITLE     Isolation and characterisation of cDNAs corresponding to two human
            calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotide
            phosphodiesterases
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 271 (2), 796-806 (1996)
  MEDLINE   96132810
REFERENCE   2  (bases 1 to 2008)
  AUTHORS   Loughney,K., Martins,T.J., Harris,E.A.S., Sadhu,K., Hicks,J.B.,
            Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A. and Ferguson,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-NOV-1995) Kate Loughney, ICOS, 22021 20th Ave. S.E.,
            Bothell, WA 98021, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2008
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            85..1692
                     /gene="PDE1A"
     CDS             85..1692
                     /gene="PDE1A"
                     /note="PDE1A3; type I phosphodiesterase"
                     /codon_start=1
                     /product="3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase"
                     /protein_id="AAC50436.1"
                     /db_xref="PID:g1151109"
                     /db_xref="GI:1151109"
                     /translation="MGSSATEIEELENTTFKYLTGEQTEKMWQRLKGILRCLVKQLER
                     GDVNVVDLKKNIEYAASVLEAVYIDETRRLLDTEDELSDIQTDSVPSEVRDWLASTFT
                     RKMGMTKKKPEEKPKFRSIVHAVQAGIFVERMYRKTYHMVGLAYPAAVIVTLKDVDKW
                     SFDVFALNEASGEHSLKFMIYELFTRYDLINRFKIPVSCLITFAEALEVGYSKYKNPY
                     HNLIHAADVTQTVHYIMLHTGIMHWLTELEILAMVFAAAIHDYEHTGTTNNFHIQTRS
                     DVAILYNDRSVLENHHVSAAYRLMQEEEMNILINLSKDDWRDLRNLVIEMVLSTDMSG
                     HFQQIKNIRNSLQQPEGIDRAKTMSLILHAADISHPAKSWKLHYRWTMALMEEFFLQG
                     DKEAELGLPFSPLCDRKSTMVAQSQIGFIDFIVEPTFSLLTDSTEKIVIPLIEEASKA
                     ETSSYVASSSTTIVGLHIADALRRSNTKGSMSDGSYSPDYSLAAVDLKSFKNNLVDII
                     QQNKERWKELAAQEARTSSQKCEFIHQ"
```

```
BASE COUNT       627 a    400 c    437 g    544 t
ORIGIN
        1 gaattctgat gtgcttcagt gcacagaaca gtaacagatg agctgctttt ggggagagct
       61 tgagtactca gtcggagcat catcatgggg tctagtgcca cagagattga agaattggaa
      121 aacaccactt ttaagtatct tacaggagaa cagactgaaa aaatgtggca gcgcctgaaa
      181 ggaatactaa gatgcttggt gaagcagctg gaaagaggtg atgttaacgt cgtcgactta
      241 aagaagaata ttgaatatgc ggcatctgtg ctggaagcag tttatatcga tgaaacaaga
      301 agacttctgg atactgaaga tgagctcagt gacattcaga ctgactcagt cccatctgaa
      361 gtccgggact ggttggcttc tacctttaca cggaaaatgg ggatgacaaa aaagaaacct
      421 gaggaaaaac caaaatttcg gagcattgtg catgctgttc aagctggaat tttgtggaa
      481 agaatgtacc gaaaaacata tcatatggtt ggtttggcat atccagcagc tgtcatcgta
      541 acattaaagg atgttgataa atggtctttc gatgtatttg ccctaaatga agcaagtgga
      601 gagcatagtc tgaagtttat gatttatgaa ctgtttacca gatatgatct tatcaaccgt
      661 ttcaagattc ctgtttcttg cctaatcacc tttgcagaag ctttagaagt tggttacagc
      721 aagtacaaaa atccatatca caatttgatt catgcagctg atgtcactca aactgtgcat
      781 tacataatgc ttcatacagg tatcatgcac tggctcactg aactggaaat tttagcaatg
      841 gtctttgctg ctgccattca tgattatgag catacaggga caacaaacaa ctttcacatt
      901 cagacaaggt cagatgttgc cattttgtat aatgatcgct ctgtccttga gaatcaccac
      961 gtgagtgcag cttatcgact tatgcaagaa gaagaaatga atatcttgat aaatttatcc
     1021 aaagatgact ggagggatct tcggaaccta gtgattgaaa tggttttatc tacagacatg
     1081 tcaggtcact tccagcaaat taaaaatata agaaacagtt tgcagcagcc tgaagggatt
     1141 gacagagcca aaaccatgtc cctgattctc cacgcagcag acatcagcca cccagccaaa
     1201 tcctggaagc tgcattatcg gtggaccatg gccctaatgg aggagttttt cctgcaggga
     1261 gataaagaag ctgaattagg gcttccattt tccccacttt gtgatcggaa gtcaaccatg
     1321 gtggcccagt cacaaatagg tttcatcgat ttcatagtag agccaacatt ttctcttctg
     1381 acagactcaa cagagaaaat tgttattcct cttatagagg aagcctcaaa agccgaaact
     1441 tcttcctatg tggcaagcag ctcaaccacc attgtggggt tacacattgc tgatgcacta
     1501 agacgatcaa atacaaaagg ctccatgagt gatgggtcct attccccaga ctactcccct
     1561 gcagcagtgg acctgaagag tttcaagaac aacctggtgg acatcattca gcagaacaaa
     1621 gagaggtgga aagagttagc tgcacaagaa gcaagaacca gttcacagaa gtgtgagttt
     1681 attcatcagt aaacaccttt aagtaaaacc tcgtgcatgg tggcagctct aatttgacca
     1741 aaagacttgg agattttgat tatgcttgct ggaaatctac cctgtcctgt gtgagacagg
     1801 aaatctattt ttgcagattg ctcaataagc atcatgagcc acataaataa cagctgtaaa
     1861 ctccttaatt caccgggctc aactgctacc gaacagattc atctagtggc tacatcagca
     1921 ccttgtgctt tcagatatct gtttcaatgg cattttgtgg catttgtctt taccgagtgc
     1981 caataaattt tctttgagca aaaaaaaa
//
```

## 3. PDE type 2

```
LOCUS       HSU67733     4240 bp    mRNA            PRI       21-MAY-1997
DEFINITION  Human cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase
            PDE2A3 (PDE2A) mRNA, complete cds.
ACCESSION   U67733
NID         g2108051
VERSION     U67733.1  GI:2108051
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 4240)
  AUTHORS   Rosman,G.J., Martins,T.J., Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A., Ferguson,K.
            and Loughney,K.
  TITLE     Isolation and characterization of human cDNAs encoding a
            cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase
  JOURNAL   Gene 191 (1), 89-95 (1997)
  MEDLINE   97354299
REFERENCE   2  (bases 1 to 4240)
  AUTHORS   Rosman,G.J., Martins,T.J., Sonnenburg,W.K., Beavo,J.A., Ferguson,K.
            and Loughney,K.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (21-AUG-1996) Icos Corporation, 22021 20th Ave. S.E.,
            Bothell, WA 98021, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..4240
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            162..2987
                     /gene="PDE2A"
     CDS             162..2987
                     /gene="PDE2A"
                     /function="cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide
                     phosphodiesterase"
                     /note="PDE2 family; splice variant 3"
                     /codon_start=1
                     /product="PDE2A3"
                     /protein_id="AAC51320.1"
                     /db_xref="PID:g2108052"
                     /db_xref="GI:2108052"
                     /translation="MGQACGHSILCRSQQYPAARPAEPRGQQVFLKPDEPPPPPQPCA
                     DSLQDALLSLGSVIDISGLQRAVKEALSAVLPRVETVYTYLLDGESQLVCEDPPHELP
                     QEGKVREAIISQKRLGCNGLGFSDLPGKPLARLVAPLAPDTQVLVMPLADKEAGAVAA
                     VILVHCGQLSDNEEWSLQAVEKHTLVALRRVQVLQQRGPREAPRAVQNPPEGTAEDQK
                     GGAAYTDRDRKILQLCGELYDLDASSLQLKVLQYLQQETRASRCCLLLVSEDNLQLSC
                     KVIGDKVLGEEVSFPLTGCLGQVVEDKKSIQLKDLTSEDVQQLQSMLGCELQAMLCVP
                     VISRATDQVVALACAFNKLEGDLFTDEDEHVIQHCFHYTSTVLTSTLAFQKEQKLKCE
```

```
                    CQALLQVAKNLFTHLDDVSVLLQEIITEARNLSNAEICSVFLLDQNELVAKVFDGGVV
                    DDESYEIRIPADQGIAGHVATTGQILNIPDAYAHPLFYRGVDDSTGFRTRNILCFPIK
                    NENQEVIGVAELVNKINGPWFSKFDEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHL
                    ANEMMMYHMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQ
                    DMNFINNYKIDCPTLARFCLMVKKGYRDPPYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLE
                    DIEIFALFISCMCHDLDHRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSVMERHHFAQAIAILNT
                    HGCNIFDHFSRKDYQRMLDLMRDIILATDLAHHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHHRL
                    LLCLLMTSCDLSDQTKGWKTTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIP
                    ELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNREHWTKVSHKFTIRGLPSNNSLD
                    FLDEEYEVPDLDGTRAPINGCCSLDAE*
BASE COUNT      902 a   1260 c   1202 g    876 t
ORIGIN
        1 cagcagagct ggattggggt gttgagtcca ggctgagtag gggcagccc actgctcttg
       61 gtccctgtgc ctgctggggg tgccctgccc tgaactccag gcagcgggga cagggcgagg
      121 tgccacctta gtctggctgg ggaggcggac gatgaggagt gatggggcag gcatgcggcc
      181 actccatcct ctgcaggagc cagcagtacc cggcagcgcg accggctgag ccgcggggcc
      241 agcaggtctt cctcaagccg gacgagccgc cgccgccgcc gcagccatgc gccgacagcc
      301 tgcaggacgc cttgctgagt ctgggctctg tcatcgacat ttcaggcctg caacgtgctg
      361 tcaaggaggc cctgtcagct gtgctccccc gagtggaaac tgtctacacc tacctactgg
      421 atggtgagtc ccagctggtg tgtgaggacc ccccacatga gctgccccag gaggggaaag
      481 tccgggaggc tatcatctcc cagaagcggc tgggctgcaa tgggctgggc ttctcagacc
      541 tgccagggaa gcccttggcc aggctggtgg ctccactggc tcctgatacc caagtgctgg
      601 tcatgccgct agcggacaag gaggctgggg ccgtggcagc tgtcatcttg gtgcactgtg
      661 gccagctgag tgataatgag gaatggagcc tgcaggcggt ggagaagcat accctggtcg
      721 ccctgcggag ggtgcaggtc ctgcagcagc gcgggcccag ggaggctccc cgagccgtcc
      781 agaacccccc ggagggggacg gcggaagacc agaagggcgg ggcggcgtac accgaccgcg
      841 accgcaagat cctccaactg tgcggggaac tctacgacct ggatgcctct tccctgcagc
      901 tcaaagtgct ccaatacctg cagcaggaga cccgggcatc ccgctgctgc ctcctgctgg
      961 tgtcggagga caatctccag ctttcttgca aggtcatcgg agacaaagtg ctcggggaag
     1021 aggtcagctt tcccttgaca ggatgcctgg gccaggtggt ggaagacaag aagtccatcc
     1081 agctgaagga cctcacctcc gaggatgtac aacagctgca gagcatgttg ggctgtgagc
     1141 tgcaggccat gctctgtgtc cctgtcatca gccgggccac tgaccaggtg gtggccttgg
     1201 cctgcgcctt caacaagcta gaaggagact tgttcaccga cgaggacgag catgtgatcc
     1261 agcactgctt ccactacacc agcaccgtgc tcaccagcac cctggccttc cagaaggaac
     1321 agaaactcaa gtgtgagtgc caggctcttc tccaagtggc aaagaacctc ttcacccacc
     1381 tggatgacgt ctctgtcctg ctccaggaga tcatcacgga ggccagaaac ctcagcaacg
     1441 cagagatctg ctctgtgttc ctgctggatc agaatgagct ggtggccaag gtgttcgacg
     1501 gggcgtggt ggatgatgag agctatgaga tccgcatccc ggccgatcag ggcatcgcgg
     1561 gacacgtggc gaccacgggc cagatcctga acatccctga cgcatatgcc catccgcttt
     1621 tctaccgcgg cgtggacgac agcaccggct tccgcacgcg caacatcctc tgcttcccca
     1681 tcaagaacga gaaccaggag gtcatcggtg tggccgagct ggtgaacaag atcaatgggc
     1741 catggttcag caagttcgac gaggacctgg cgacggcctt ctccatctac tgcggcatca
     1801 gcatcgccca ttctctccta tacaaaaaag tgaatgaggc tcagtatcgc agccacctgg
     1861 ccaatgagat gatgatgtac cacatgaagg tctccgacga tgagtatacc aaacttctcc
     1921 atgatgggat ccagcctgtg gctgccattg actccaattt tgcaagtttc acctataccc
     1981 ctcgttccct gcccgaggat gacacgtcca tggccatcct gagcatgctg caggacatga
     2041 atttcatcaa caactacaaa attgactgcc cgaccctggc ccggttctgt ttgatggtga
     2101 agaagggcta ccgggatccc ccctaccaca actggatgca cgccttttct gtctcccact
     2161 tctgctacct gctctacaag aacctggagc tcaccaacta cctcgaggac atcgagatct
     2221 ttgccttgtt tatttcctgc atgtgtcatg acctggacca cagaggcaca aacaactctt
     2281 tccaggtggc ctcgaaatct gtgctggctg cgctctacag ctctgagggc tccgtcatgg
```

```
2341 agaggcacca ctttgctcag gccatcgcca tcctcaacac ccacggctgc aacatctttg
2401 atcatttctc ccggaaggac tatcagcgca tgctggatct gatgcgggac atcatcttgg
2461 ccacagacct ggcccaccat ctccgcatct tcaaggacct ccagaagatg gctgaggtgg
2521 gctacgaccg aaacaacaag cagcaccaca gacttctcct ctgcctcctc atgacctcct
2581 gtgacctctc tgaccagacc aagggctgga agactacgag aaagatcgcg gagctgatct
2641 acaaagaatt cttctcccag ggagacctgg agaaggccat gggcaacagg ccgatggaga
2701 tgatggaccg ggagaaggcc tatatccctg agctgcaaat cagcttcatg gagcacattg
2761 caatgcccat ctacaagctg ttgcaggacc tgttccccaa agcggcagag ctgtacgagc
2821 gcgtggcctc caaccgtgag cactggacca aggtgtccca caagttcacc atccgcggcc
2881 tcccaagtaa caactcgctg gacttcctgg atgaggagta cgaggtgcct gatctggatg
2941 gcactagggc ccccatcaat ggctgctgca gccttgatgc tgagtgatcc cctccaggac
3001 acttccctgc ccaggccacc tcccacagcc ctccactggt ctggccagat gcactgggaa
3061 cagagccacg ggtcctgggt cctagaccag gacttcctgt gtgaccctgg acaagtacta
3121 ccttcctggg cctcagcttt ctcgtctgta taatggaagc aagacttcca acctcacgga
3181 gactttgtaa tttgcttctc tgagagcaca ggggtgacca atgagcagtg ggccctactc
3241 tgcacctctg accacacctt ggcaagtctt tcccaagcca ttctttgtct gagcagcttg
3301 atggtttctc cttgccccat ttctgcccca ccagatcttt gctcctttcc ctttgaggac
3361 tcccaccctt tgggtctcca ggatcctcat ggaaggggaa ggtgagacat ctgagtgagc
3421 agagtgtggc atcttggaaa cagtccttag ttctgtggga ggactagaaa cagccgcggc
3481 gaaggccccc tgaggaccac tactatactg atggtgggat tgggacctgg gggatacagg
3541 ggccccagga agaagctggc cagaggggca gctcagtgct ctgcagagag gggccctggg
3601 gagaagcagg atgggattga tgggcaggag ggatccccgc actgggagac aggcccaggt
3661 atgaatgagc cagccatgct tcctcctgcc tgtgtgacgc tgggcgagtc tcttcccctg
3721 tctgggccaa acagggagcg ggtaagacaa tccatgctct aagatccatt ttagatcaat
3781 gtctaaaata gctctatggc tctgcggagt cccagcagag gctatggaat gtttctgcaa
3841 ccctaaggca cagagagcca accctgagtg tctcagaggc cccctgagtg ttccccttgg
3901 cctgagcccc ttacccattc ctgcagccag tgagagacct ggcctcagcc tggcagcgct
3961 ctcttcaagg ccatatccac ctgtgccctg ggcttggga gaccccatag gccgggactc
4021 ttgggtcagc ccgccactgg cttctctctt tttctccgtt tcattctgtg tgcgttgtgg
4081 ggtgggggag gggtccacc tgccttacct ttctgagttg cctttagaga gatgcgtttt
4141 tctaggactc tgtgcaactg tcgtatatgg tcccgtgggc tgaccgcttt gtacatgaga
4201 ataaatctat ttctttctac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

## 4. NPY

```
LOCUS       HUMNPY         551 bp    mRNA            PRI       07-JAN-1995
DEFINITION  Human neuropeptide Y (NPY) mRNA, complete cds.
ACCESSION   K01911
NID         g189273
VERSION     K01911.1  GI:189273
KEYWORDS    neuropeptide Y.
SOURCE      Human pheochromocytoma, cDNA to mRNA, clone pNPY3-75.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 551)
  AUTHORS   Minth,C.D., Bloom,S.R., Polak,J.M. and Dixon,J.E.
  TITLE     Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA
            encoding neuropeptide tyrosine
  JOURNAL   Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 (14), 4577-4581 (1984)
  MEDLINE   84272678
COMMENT     Neuropeptide Y (NPY) is one of the most abundant peptides in the
            mammalian nervous system, and its extensive distribution suggests a
            neuro-transmitter or -modulator role. NPY is also found in some
            chromaffin cells of the adrenal medulla.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..551
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /tissue_type="pheochromocytoma"
                     /map="7pter-q22"
     mRNA            <1..551
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
     gene            1..551
                     /gene="NPY"
     sig_peptide     87..170
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
     CDS             87..380
                     /gene="NPY"
                     /codon_start=1
                     /db_xref="GDB:G00-119-456"
                     /product="neuropeptide Y"
                     /protein_id="AAA59944.1"
                     /db_xref="PID:g189274"
                     /db_xref="GI:189274"
                     /translation="MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAED
                     MARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRLEDPAMW"
     mat_peptide     171..278
                     /gene="NPY"
                     /note="G00-119-456"
```

```
                    /product="neuropeptide Y"
BASE COUNT      131 a    171 c    129 g    120 t
ORIGIN      51 bp upstream of RsaI site.
        1 accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc
       61 ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgactgggg ctgtccggac
      121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgaggcg taccccctcca
      181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
      241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
      301 cactgatttc agacctcttg atgagagaaa gcacagaaaa tgttcccaga actcggcttg
      361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
      421 gcccatattt catcgtgtaa aacgagaatc cacccatcct accaatgcat gcagccactg
      481 tgctgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
      541 atcatgcatt c
```

## 5. NPY Y1 Receptor

```
LOCUS       A26481       2624 bp    mRNA            PAT       17-OCT-1995
DEFINITION  Human NPY receptor Y1 gene cDNA.
ACCESSION   A26481
NID         g1247452
VERSION     A26481.1  GI:1247452
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
            Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2624)
  AUTHORS   .
  TITLE     HUMAN NEUROPEPTIDE Y-Y1 RECEPTOR
  JOURNAL   Patent: WO 9309227-A 3 13-MAY-1993;
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2624
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     CDS             152..1306
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y Y1 receptor"
                     /protein_id="CAA01819.1"
                     /db_xref="PID:e205126"
                     /db_xref="PID:g1247453"
                     /db_xref="GI:1247453"
                     /db_xref="SWISS-PROT:P25929"
                     /translation="MNSTLFSQVENHSVHSNFSEKNAQLLAFENDDCHLPLAMIFTLA
                     LAYGAVIILGVSGNLALIIIILKQKEMRNVTNILIVNLSFSDLLVAIMCLPFTFVYTL
                     MDHWVFGEAMCKLNPFVQCVSITVSIFSLVLIAVERHQLIINPRGWRPNNRHAYVGIA
                     VIWVLAVASSLPFLIYQVMTDEPFQNVTLDAYKDKYVCFDQFPSDSHRLSYTTLLLVL
                     QYFGPLCFIFICYFKIYIRLKRRNNMMDKMRDNKYRSSETKRINIMLLSIVVAFAVCW
                     LPLTIFNTVFDWNHQIIATCNHNLLFLLCHLTAMISTCVNPIFYGFLNKNFQRDLQFF
                     FNFCDFRSRDDDYETIAMSTMHTDVSKTSLKQASPVAFKKINNNDDNEKI"
BASE COUNT      791 a    479 c    473 g    878 t      3 others
ORIGIN
        1 attgttcagt tcaagggaat gaagaattca gaataatttt ggtaaatgga ttccaatatc
       61 gggaataaga ataagctgaa cagttgacct gctttgaaga aacatactgt ccatttgtct
      121 aaaataatct ataacaacca aaccaatcaa aatgaattca acattatttt cccaggttga
      181 aaatcattca gtccactcta atttctcaga gaagaatgcc cagcttctgg cttttgaaaa
      241 tgatgattgt catctgccct tggccatgat atttacctta gctcttgctt atggagctgt
      301 gatcattctt ggtgtctctg gaaacctggc cttgatcata atcatcttga aacaaaagga
      361 gatgagaaat gttaccaaca tcctgattgt gaacctttcc ttctcagact tgcttgttgc
      421 catcatgtgt ctcccctttа catttgtcta cacattaatg gaccactggg tctttggtga
      481 ggcgatgtgt aagttgaatc cttttgtgca atgtgtttca atcactgtgt ccattttctc
      541 tctggttctc attgctgtgg aacgacatca gctgataatc aaccctcgag ggtggagacc
      601 aaataataga catgcttatg taggtattgc tgtgatttgg gtccttgctg tggcttcttc
      661 tttgcctttc ctgatctacc aagtaatgac tgatgagccg ttccaaaatg taacacttga
```

```
 721 tgcgtacaaa gacaaatacg tgtgctttga tcaatttcca tcggactctc ataggttgtc
 781 ttataccact ctcctcttgg tgctgcagta ttttggtcca ctttgtttta tatttatttg
 841 ctacttcaag atatatatac gcctaaaaag gagaaacaac atgatggaca agatgagaga
 901 caataagtac aggtccagtg aaaccaaaag aatcaatatc atgctgctct ccattgtggt
 961 agcatttgca gtctgctggc tcccctcttac catctttaac actgtgtttg attggaatca
1021 tcagatcatt gctacctgca accacaatct gttattcctg ctctgccacc tcacagcaat
1081 gatatccact tgtgtcaacc ccatatttta tgggttcctg aacaaaaact tccagagaga
1141 cttgcagttc ttcttcaact tttgtgattt ccggtctcgg gatgatgatt atgaaacaat
1201 agccatgtcc acgatgcaca cagatgtttc caaaacttct ttgaagcaag caagcccagt
1261 cgcatttaaa aaaatcaaca acaatgatga taatgaaaaa atctgaaact acttatagcc
1321 tatggtcccg gatgacatct gtttaaaaac aagcacaacc tgcaacatac tttgattacc
1381 tgttctccca aggaatgggg ttgaaatcat ttgaaaatga ctaagatttt cttgtcttgc
1441 tttttttactg cttttgttgt agtgtcataa ttacatttgg aacaaaaggt gtgggctttg
1501 gggtcttctg gaaatagttt tgaccagaca tctttgaagt gctttttgtg aatttatgca
1561 tataatataa agacttttat actgtactta ttggaatgaa atttctttaa agtattacga
1621 tnnnctgact tcagaagtac ctgccatcca atacggtcat tagattgggt catcttgatt
1681 agattagatt agattagatt gtcaacagat tgggccatcc ttactttatg ataggcatca
1741 ttttagtgtg ttacaatagt aacagtatgc aaaagcagca ttcaggagcc gaaagatagt
1801 cttgaagtca ttcagaagtg gtttgaggtt tctgtttttt ggtggttttt gtttgttttt
1861 tttttttttc accttaaggg aggctttcat ttcctcccga ctgattgtca cttaaatcaa
1921 aatttaaaaa tgaataaaaa gacatacttc tcagctgcaa atattatgga gaattgggca
1981 cccacaggaa tgaagagaga aagcagctcc ccaacttcaa aaccattttg gtacctgaca
2041 acaagagcat tttagagtaa ttaatttaat aaagtaaatt agtattgctg caaatagcta
2101 aattatattt atttgaattg atggtcaaga gattttccat ttttttttaca gactgttcag
2161 tgtttgtcaa gcttctggtc taatatgtac tcgaaagact ttccgcttac aatttgtaga
2221 aacacaaata tcgttttcca tacagcagtg cctatatagt gactgatttt aactttcaat
2281 gtccatcttt caaaggaagt aacaccaagg tacaatgtta aaggaatatt cactttacct
2341 agcagggaaa aatacacaaa aactgcagat acttcatata gcccatttta acttgtataa
2401 actgtgtgac ttgtggcgtc ttataaataa tgcactgtaa agattactga atagttgtgt
2461 catgttaatg tgcctaattt catgtatctt gtaatcatga ttgagcctca gaatcatttg
2521 gagaaactat attttaaaga acaagacata cttcaatgta ttatacagat aaagtattac
2581 atgtgtttga ttttaaaagg gcggacattt tattaaaatc aagg
```

## 6. NPY Y2 Receptor

```
LOCUS       HSU36269      1200 bp    mRNA            PRI       14-NOV-1995
DEFINITION  Human neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor mRNA, complete cds.
ACCESSION   U36269
NID         g1063633
VERSION     U36269.1  GI:1063633
KEYWORDS    .
SOURCE      Human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1200)
  AUTHORS   Gerald,C., Walker,M.W., Vaysse,P.J., He,C., Branchek,T.A. and
            Weinshank,R.L.
  TITLE     Expression cloning and pharmacological characterization of a human
            hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 270 (45), 26758-26761 (1995)
  MEDLINE   96070760
REFERENCE   2  (bases 1 to 1200)
  AUTHORS   Gerald,C.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (13-SEP-1995) Christophe A. Gerald, Synaptic
            Pharmaceutical Corporation, Molecular Biology, 215 College Road,
            Paramus, NJ 07652, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1200
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /clone="hhY2"
                     /sex="male"
                     /tissue_type="brain hippocampus"
                     /dev_stage="adult"
     5'UTR           1..20
     CDS             21..1166
                     /note="NPY/PYY Y2 receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor"
                     /protein_id="AAC50281.1"
                     /db_xref="PID:g1063634"
                     /db_xref="GI:1063634"
                     /translation="MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGPQTTPRGELVPDPEPELIDST
                     KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTL
                     CLPFTLTYTLMGEWKMGPVLCHLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKI
                     SKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEKSIYGTV
                     YSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAANDHYHQRRQKTTKMLVCVVVV
                     FAVSWLPLHAFQLAVDIDSQVLDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRK
                     AFLSAFRCEQRLDAIHSEVSVTFKAKKNLEVRKNSGPNDSFTEATNV"
     3'UTR           1164..1200
```

2115

```
BASE COUNT      292 a    295 c    299 g    314 t
ORIGIN
        1 caagtggacc tgtactgaaa atgggtccaa taggtgcaga ggctgatgag aaccagacag
       61 tggaagaaat gaaggtggaa caatacgggc cacaaacaac tcctagaggt gaactggtcc
      121 ctgaccctga gccagagctt atagatagta ccaagctgat tgaggtacaa gttgttctca
      181 tattggccta ctgctccatc atcttgcttg ggtaattgg caactccttg gtgatccatg
      241 tggtgatcaa attcaagagc atgcgcacag taaccaactt tttcattgcc aatctggctg
      301 tggcagatct tttggtgaac actctgtgtc taccgttcac tcttacctat accttaatgg
      361 gggagtggaa aatgggtcct gtcctgtgcc acctggtgcc ctatgcccag ggcctggcag
      421 tacaagtatc cacaatcacc ttgacagtaa ttgccctgga ccggcacagg tgcatcgtct
      481 accacctaga gagcaagatc tccaagcgaa tcagcttcct gattattggc ttggcctggg
      541 gcatcagtgc cctgctggca agtcccctgg ccatcttccg ggagtattcg ctgattgaga
      601 tcatcccgga ctttgagatt gtggcctgta ctgaaaagtg gcctggcgag gagaagagca
      661 tctatggcac tgtctatagt ctttcttcct tgttgatctt gtatgttttg cctctgggca
      721 ttatatcatt ttcctacact cgcatttgga gtaaattgaa gaaccatgtc agtcctggag
      781 ctgcaaatga ccactaccat cagcgaaggc aaaaaaccac caaaatgctg gtgtgtgtgg
      841 tggtggtgtt tgcggtcagc tggctgcctc tccatgcctt ccagcttgcc gttgacattg
      901 acagccaggt cctggacctg aaggagtaca aactcatctt cacagtgttc cacatcatcg
      961 ccatgtgctc cacttttgcc aatcccctc tctatggctg gatgaacagc aactacagaa
     1021 aggctttcct ctcggccttc cgctgtgagc agcggttgga tgccattcac tctgaggtgt
     1081 ccgtgacatt caaggctaaa aagaacctgg aggtcagaaa gaacagtggc cccaatgact
     1141 ctttcacaga ggctaccaat gtctaaggaa gctgtggtgt gaaaatgtat ggatgaattc
```

## 7. NPY Y5 Receptor

```
LOCUS       HSU66275     1370 bp    mRNA            PRI       18-OCT-1996
DEFINITION  Human neuropeptide Y5 receptor (NPYR5) mRNA, complete cds.
ACCESSION   U66275
NID         g1620655
VERSION     U66275.1  GI:1620655
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1370)
  AUTHORS   Hu,Y., Bloomquist,B.T., Cornfield,L.J., DeCarr,L.B.,
            Flores-Riveros,J.R., Friedman,L., Jiang,P., Lewis-Higgins,L.,
            Sadlowski,Y., Schaefer,J., Velazquez,N. and McCaleb,M.L.
  TITLE     Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor
            associated with feeding behavior
  JOURNAL   J. Biol. Chem. 271 (42), 26315-26319 (1996)
  MEDLINE   96421636
REFERENCE   2  (bases 1 to 1370)
  AUTHORS   Hu,Y., Bloomquist,B.T., Cornfield,L.J., DeCarr,L.B.,
            Flores-Riveros,J.R., Friedman,L., Jiang,P., Lewis-Higgins,L.,
            Sadlowski,Y., Schaefer,J., Velazquez,N. and McCaleb,M.L.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-AUG-1996) Metabolic Disorders, Bayer Corporation, 400
            Morgan Lane, West Haven, CT 06516, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1370
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
     gene            18..1355
                     /gene="NPYR5"
     CDS             18..1355
                     /gene="NPYR5"
                     /function="G protein-coupled receptor"
                     /codon_start=1
                     /product="neuropeptide Y5 receptor"
                     /protein_id="AAC50741.1"
                     /db_xref="PID:g1620656"
                     /db_xref="GI:1620656"
                     /translation="MDLELDEYYNKTLATENNTAATRNSDFPVWDDYKSSVDDLQYFL
                     IGLYTFVSLLGFMGNLLILMALMKKRNQKTTVNFLIGNLAFSDILVVLFCSPFTLTSV
                     LLDQWMFGKVMCHIMPFLQCVSVLVSTLILISIAIVRYHMIKHPISNNLTANHGYFLI
                     ATVWTLGFAICSPLPVFHSLVELQETFGSALLSSRYLCVESWPSDSYRIAFTISLLLV
                     QYILPLVCLTVSHTSVCRSISCGLSNKENRLEENEMINLTLHPSKKSGPQVKLSGSHK
                     WSYSFIKKHRRRYSKKTACVLPAPERPSQENHSRILPENFGSVRSQLSSSSKFIPGVP
                     TCFEIKPEENSDVHELRVKRSVTRIKKRSRSVFYRLTILILVFAVSWMPLHLFHVVTD
                     FNDNLISNRHFKLVYCICHLLGMMSCCLNPILYGFLNNGIKADLVSLIHCLHM"
```

```
BASE COUNT      392 a    263 c    257 g    458 t
ORIGIN
        1 ccaagcagga ctataatatg gatttagagc tcgacgagta ttataacaag acacttgcca
       61 cagagaataa tactgctgcc actcggaatt ctgatttccc agtctgggat gactataaaa
      121 gcagtgtaga tgacttacag tattttctga ttgggctcta tacatttgta agtcttcttg
      181 gctttatggg gaatctactt attttaatgg ctctcatgaa aaagcgtaat cagaagacta
      241 cggtaaactt cctcataggc aatctggcct tttctgatat cttggttgtg ctgttttgct
      301 cacctttcac actgacgtct gtcttgctgg atcagtggat gtttggcaaa gtcatgtgcc
      361 atattatgcc ttttcttcaa tgtgtgtcag ttttggtttc aactttaatt ttaatatcaa
      421 ttgccattgt caggtatcat atgataaaac atcccatatc taataattta acagcaaacc
      481 atggctactt tctgatagct actgtctgga cactaggttt tgccatctgt tctccccttc
      541 cagtgtttca cagtcttgtg gaacttcaag aaacatttgg ttcagcattg ctgagcagca
      601 ggtatttatg tgttgagtca tggccatctg attcatacag aattgccttt actatctctt
      661 tattgctagt tcagtatatt ctgcccttag tttgtcttac tgtaagtcat acaagtgtct
      721 gcagaagtat aagctgtgga ttgtccaaca aagaaaacag acttgaagaa aatgagatga
      781 tcaacttaac tcttcatcca tccaaaaaga gtgggcctca ggtgaaactc tctggcagcc
      841 ataaatggag ttattcattc atcaaaaaac acagaagaag atatagcaag aagacagcat
      901 gtgtgttacc tgctccagaa agaccttctc aagagaacca ctccagaata cttccagaaa
      961 actttggctc tgtaagaagt cagctctctt catccagtaa gttcatacca ggggtcccca
     1021 cttgctttga gataaaacct gaagaaaatt cagatgttca tgaattgaga gtaaaacgtt
     1081 ctgttacaag aataaaaaag agatctcgaa gtgttttcta cagactgacc atactgatat
     1141 tagtatttgc tgttagttgg atgccactac accttttcca tgtggtaact gattttaatg
     1201 acaatcttat ttcaaatagg catttcaagt tggtgtattg catttgtcat ttgttgggca
     1261 tgatgtcctg ttgtcttaat ccaattctat atgggtttct taataatggg attaaagctg
     1321 atttagtgtc ccttatacac tgtcttcata tgtaataatt ctcactgttt
```

## 8. VIP

```
LOCUS       VIP          1511 bp    mRNA             PRI       19-MAR-1999
DEFINITION  Homo sapiens vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA.
ACCESSION   NM_003381
NID         g4507896
VERSION     NM_003381.1  GI:4507896
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1511)
  AUTHORS   DeLamarter,J.F., Buell,G.N., Kawashima,E., Polak,J.M. and
            Bloom,S.R.
  TITLE     Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in
            bacterial cells
  JOURNAL   Peptides 6 Suppl 1, 95-102 (1985)
  MEDLINE   86016352
COMMENT     REFSEQ: This reference sequence was derived from M36634.
            PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
            that has not yet been subject to human review. The final curated
            reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1511
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579
                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331
BASE COUNT      541 a    255 c    276 g    439 t
ORIGIN
        1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
       61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
      121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
      181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
      241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
      301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
      361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
      421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
      481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
      541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
      601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
      661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
      721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
      781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
      841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
      901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
      961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
     1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
     1081 ataaaaagac attcttccaa aaagatttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
     1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
     1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
     1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
     1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
     1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
     1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
     1501 aaaaaaaaaa a
```

## 9. VPAC1 Receptor

```
LOCUS       VIP          1511 bp    mRNA            PRI       19-MAR-1999
DEFINITION  Homo sapiens vasoactive intestinal peptide (VIP) mRNA.
ACCESSION   NM_003381
NID         g4507896
VERSION     NM_003381.1  GI:4507896
KEYWORDS    .
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1511)
  AUTHORS   DeLamarter,J.F., Buell,G.N., Kawashima,E., Polak,J.M. and
            Bloom,S.R.
  TITLE     Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in
            bacterial cells
  JOURNAL   Peptides 6 Suppl 1, 95-102 (1985)
  MEDLINE   86016352
COMMENT     REFSEQ: This reference sequence was derived from M36634.
            PROVISIONAL RefSeq: This is a provisional reference sequence record
            that has not yet been subject to human review. The final curated
            reference sequence record may be somewhat different from this one.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1511
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579
                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
```

2118

```
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331
BASE COUNT       541 a    255 c    276 g    439 t
ORIGIN
        1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
       61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
      121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
      181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
      241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
      301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
      361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
      421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
      481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
      541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
      601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
      661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
      721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
      781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
      841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
      901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
      961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
     1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
     1081 ataaaaagac attcttccaa aaagattttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
     1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
     1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
     1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
     1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
     1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
     1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
     1501 aaaaaaaaaa a
```

## 10. VPAC2 Receptor

```
LOCUS       HUMHVRP      1640 bp    mRNA            PRI       16-FEB-1995
DEFINITION  Human helodermin-preferring VIP receptor (VIP2/PACAP receptor)
            mRNA, complete cds.
ACCESSION   L36566
NID         g550477
VERSION     L36566.1  GI:550477
KEYWORDS    PACAP receptor; VIP receptor; helodermin-preferring VIP receptor.
SOURCE      Homo sapiens cDNA to mRNA.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Mammalia;
            Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1640)
  AUTHORS   Svoboda,M., Tastenoy,M., Van Rampelbergh,J., Goossens,J.F., De
            Neef,P., Waelbroeck,M. and Robberecht,P.
  TITLE     Molecular cloning and functional characterization of a human VIP
            receptor from SUP-T1 lymphoblasts
  JOURNAL   Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (3), 1617-1624 (1994)
  MEDLINE   95110300
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1640
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_line="SUP T1 lymphoblast"
                     /clone_lib="lamda ZAP II"
     sig_peptide     163..231
                     /note="putative; putative"
     CDS             163..1479
                     /note="human VIP2 receptor was previously called
                     'helodermin-preferring VIP receptor'; transmembrane
                     domains are located at positions: 637-696; 772-844;
                     880-948; 1003-1071; 1147-1209; 1243-1302.; Potential
                     glycosylation sites are located at :334-336; 424-426;
                     436-438."
                     /codon_start=1
                     /function="VIP and PACAP receptor"
                     /protein_id="AAC37569.1"
                     /db_xref="PID:g550478"
                     /db_xref="GI:550478"
                     /translation="MRTLLPPALLTCWLLAPVNSIHPECRFHLEIQEEETKCTELLRS
                     QTEKHKACSGVWDNITCWRPANVGETVTVPCPKVFSNFYSKAGNISKNCTSDGWSETF
                     PDFVDACGYSDPEDESKITFYILVKAIYTLGYSVSLMSLATGSIILCLFRKLHCTRNY
                     IHLNLFLSFILRAISVLVKDDVLYSSSGTLHCPDQPSSWVGCKLSLVFLQYCIMANFF
                     WLLVEGLYLHTLLVAMLPPRRCFLAYLLIGWGLPTVCIGAWTAARLYLEDTGCWDTND
                     HSVPWWVIRIPILISIIVNFVLFISIIRILLQKLTSPDVGGNDQSQYKRLAKSTLLLI
                     PLFGVHYMVFAVFPISISSKYQILFELCLGSFQGLVVAVLYCFLNSEVQCELKRKWRS
                     RCPTPSASRDYRVCGSSFSHNGSEGALQFHRASRAQSFLQTETSVI"
     mat_peptide     232..1476
```

2119

```
                     /function="VIP and PACAP receptor"
BASE COUNT      315 a    512 c    461 g    352 t
ORIGIN
        1 cgggacgagg gggcggcccc cgcgctcggg gcgctcggct acagctgcgg ggcccgaggt
       61 ctccgcgcac tcgctcccgg cccatgctgg aggcggcgga acccggggga cctaggacgg
      121 aggcggcggg cgctgggcgg cccccggcac gctgagctcg ggatgcggac gctgctgcct
      181 cccgcgctgc tgacctgctg gctgctcgcc cccgtgaaca gcattcaccc agaatgccga
      241 tttcatctgg aaatacagga ggaagaaaca aaatgtacag agcttctgag gtctcaaaca
      301 gaaaaacaca aagcctgcag tggcgtctgg gacaacatca cgtgctggcg gcctgccaat
      361 gtgggagaga ccgtcacggt gccctgccca aaagtcttca gcaattttta cagcaaagca
      421 ggaaacataa gcaaaaactg tacgagtgac ggatggtcag agacgttccc agatttcgtc
      481 gatgcctgtg gctacagcga cccggaggat gagagcaaga tcacgtttta tattctggtg
      541 aaggccattt ataccctggg ctacagtgtc tctctgatgt ctcttgcaac aggaagcata
      601 attctgtgcc tcttcaggaa gctgcactgc accaggaatt acatccacct gaacctgttc
      661 ctgtccttca tcctgagagc catctcagtg ctggtcaagg acgacgttct ctactccagc
      721 tctggcacgt tgcactgccc tgaccagcca tcctcctggg tgggctgcaa gctgagcctg
      781 gtcttcctgc agtactgcat catggccaac ttcttctggc tgctggtgga ggggctctac
      841 ctccacaccc tcctggtggc catgctcccc cctagaaggt gcttcctggc ctacctcctg
      901 atcggatggg gcctccccac cgtctgcatc ggtgcatgga ctgcggccag gctctactta
      961 gaagacaccg gttgctggga tacaaacgac cacagtgtgc cctggtgggt catacgaata
     1021 ccgattttaa tttccatcat cgtcaatttt gtcctttttca ttagtattat acgaattttg
     1081 ctgcagaagt taacatcccc agatgtcggc ggcaacgacc agtctcagta caagaggctg
     1141 gccaagtcca cgctcctgct tatcccgctg ttcggcgtcc actacatggt gtttgccgtg
     1201 tttcccatca gcatctcctc caaataccag atactgtttg agctgtgcct cgggtcgttc
     1261 cagggcctgg tggtggccgt cctctactgt ttcctgaaca gtgaggtgca gtgcgagctg
     1321 aagcgaaaat ggcgaagccg gtgcccgacc ccgtccgcga gccgggatta cagggtctgc
     1381 ggttcctcct tctcccacaa cggctcggag ggcgccctgc agttccaccg cgcgtcccga
     1441 gcccagtcct tcctgcaaac ggagacctcg gtcatctagc cccacccctg cctgtcggac
     1501 gcggcgggag gcccacggtt cggggcttct gcggggctga gacgccggct tcctccttcc
     1561 agatgcccga gcaccgtgtc gggcaggtca gcgcggtcct gactccgtca agctggttgt
     1621 ccactaaacc ccatacctgg
```

## ABBREVIATIONS

FSD = female sexual dysfunction
FSAD = female sexual arousal disorder

cAMP = cyclic adenosine-3',5'-monophosphate
cGMP = cyclic guanosine-3',5'-monophosphate

$P_{cAMP}$ = potentiator of cAMP
$P_{cGMP}$ = potentiator of cGMP

$A_{cAMP}$ = activator of cAMP
$A_{cGMP}$ = activator of cGMP

$AM_{cAMP}$ = adverse modulator of cAMP
$AM_{cGMP}$ = adverse modulator of cGMP

$I_{cAMP}$ = inhibitor of cAMP
$I_{cGMP}$ = inhibitor of cGMP
$I{:}I_{cAMP}$ = inhibitor of an inhibitor of cAMP
$I{:}I_{cGMP}$ = inhibitor of an inhibitor of cGMP
$I{:}AM_{cAMP}$ = inhibitor of an adverse modulator of cAMP
$I{:}AM_{cGMP}$ = inhibitor of an adverse modulator of cGMP
$U{:}A_{cAMP}$ = upregulator of activator of cAMP
$U{:}A_{cGMP}$ = upregulator of activator of cGMP

AC = adenylate cyclase
A:AC = activator of AC

NEP = neutral endopeptidase
I:NEP = inhibitor of NEP

VIP = vasoactive intestinal peptide
VIPr = receptor of VIP (may be expressed as VIPR)
$VIP_n$ = receptor sub-type of VIP (such as VIPR1, VIPR2)
A:VIPr = activator of VIPr
$A{:}VIP_n$ = activator of $VIP_n$

I:VIPr = inhibitor of VIPr

I:$\text{VIP}_n$ = inhibitor of $\text{VIP}_n$

I:I:VIPr = inhibitor of an inhibitor of VIPr

I:I:$\text{VIP}_n$ = inhibitor of an inhibitor of $\text{VIP}_n$

PDE = phosphodiesterase

PDEn = PDE family (e.g. PDE1, PDE2 etc.)

$\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ = PDE capable of hydrolysing cAMP

$\text{PDE}_{\text{cGMP}}$ = PDE capable of hydrolysing cGMP

I:$\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ = inhibitor of a PDE capable of hydrolysing cAMP

I:$\text{PDE}_{\text{cAMP}}$ = inhibitor of a PDE family capable of hydrolysing cAMP

NPY = neuropeptide Y

NPYr = receptor of NPY (may be expressed as NPYR)

NPY $\text{Y}_n$ = $\text{Y}_n$ receptor sub-type of NPY (e.g. NPY $\text{Y}_1$) (e.g. NPYR1)

I:NPY = inhibitor of NPY

I:NPY $\text{Y}_n$ = inhibitor of NPY $\text{Y}_n$

kDa = kilodalton

bp = base pair

kb = kilobase pair

## CLAIMS

1. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD, preferably FSAD; the pharmaceutical composition comprising an agent capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

2. A pharmaceutical composition according to claim 1 wherein the agent is a mediator of genital (e.g. vaginal or clitoral) vasorelaxation.

3. A pharmaceutical composition according to claim 1 or claim 2 wherein the composition is for oral administration.

4. A pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 3 wherein the said cAMP is endogenous cAMP.

5. A pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 4 wherein the composition is applied before or during sexual stimulation.

6. Use of an agent in the manufacture of a medicament for the treatment of FSD, preferably FSAD; wherein the agent is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia of a female suffering from FSD, preferably FSAD.

7. Use according to claim 6 wherein the agent is a mediator of genital (e.g. vaginal or clitoral) vasorelaxation.

8. Use according to claim 6 or claim 7 wherein the medicament is for oral administration.

9. Use according to any one of claims 6 to 8 wherein the said cAMP is endogenous cAMP.

10. Use according to any one of claims 6 to 9 wherein the composition is applied before or during sexual stimulation.

11. A method of treating a female (such as a female suffering from FSD, preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

12. A method according to claim 11 wherein the agent is a mediator of genital (e.g. vaginal or clitoral) vasorelaxation.

13. A method according to claim 11 or claim 12 wherein the agent is orally administered.

14. A method according to any one of claims 11 to 13 wherein the said cAMP is endogenous cAMP.

15. A pharmaceutical composition according to any one of claims 11 to 14 wherein the composition is applied before or during sexual stimulation.

16. An assay method for identifying an agent that can be used to treat FSD, in particular FSAD, the assay method comprising: determining whether an agent can directly or indirectly potentiate cAMP; wherein a potentiation of cAMP in the presence of the agent is indicative that the agent may be useful in the treatment of FSD, in particular FSAD.

17. A process comprising the steps of:

(a) performing the assay according to claim 16;

(b) identifying one or more agents that can directly or indirectly potentiate cAMP; and

(c) preparing a quantity of those one or more identified agents.

18. A method of treating FSD, preferably FSAD, by potentiating *in vivo* cAMP with an agent;

wherein the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP in an *in vitro* assay method;

wherein the *in vitro* assay method is the assay method defined in claim 16.

19. Use of an agent in the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of FSD, preferably FSAD, the agent is capable of directly or indirectly potentiating cAMP when assayed *in vitro* by the assay method according to claim 16.

20. An agent identified by the assay method according to claim 16.

21. An agent according to claim 20 for use in medicine.

22. An agent according to claim 21 for use in treating FSD, preferably FSAD.

23. A medicament for oral administration to treat FSD, preferably FSAD, wherein the medicament comprises the agent according to claim 20.

24. A diagnostic method, the method comprising isolating a sample from a female; determining whether the sample contains an entity present in such an amount to cause FSD, preferably FSAD, or is in an amount so as to cause FSD, preferably FSAD; wherein the entity has a direct or indirect effect on the level or activity of cAMP in the sexual genitalia of the female.

25. A diagnostic composition or kit comprising means for detecting an entity in an isolated female sample; wherein the means can be used to determine whether the sample contains the entity and in such an amount to cause FSD, preferably FSAD, or is in an amount so as to cause FSD, preferably FSAD; wherein the entity has a direct or indirect effect on the level or activity of cAMP in the sexual genitalia of the female.

26. An animal model used to identify agents capable of treating FSD, preferably FSAD, said model comprising an anaesthetised female animal including means to measure changes in genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow of said animal following stimulation of the pelvic nerve thereof.

27. An assay method for identifying an agent that can directly or indirectly potentiate cAMP in order to treat FSD, preferably FSAD, the assay method comprising: administering an agent to the animal model of claim 26; and measuring any potentiation of cAMP and/or increase in blood flow in the genital (e.g. vaginal or clitoral) of said animal.

28. An agent identified by the assay method according to claim 27.

29. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in the treatment of FSD (preferably FSAD); the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

30. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for the treatment of FSD (preferably FSAD); and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

31. A method of treating a female suffering from FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

32. A pharmaceutical composition for use (or when in use) in enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; the pharmaceutical composition comprising an agent; wherein the agent is optionally admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

33. The use of an agent in the manufacture of a medicament (such as a pharmaceutical composition) for enhancing genital (e.g. vaginal or clitoral) blood flow; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

34. A method of treating a female for FSD (preferably FSAD) or to prevent FSD (preferably FSAD); the method comprising delivering to the female an agent; and wherein said agent is at least one or more of: an I:PDE, an I:NEP, an I:NPY.

35. The invention according to any one of claims 29 to 34 wherein said agent potentiates cAMP.

36. The invention according to any one of the preceding claims wherein said cAMP is endogenous cAMP (as defined herein).

2123

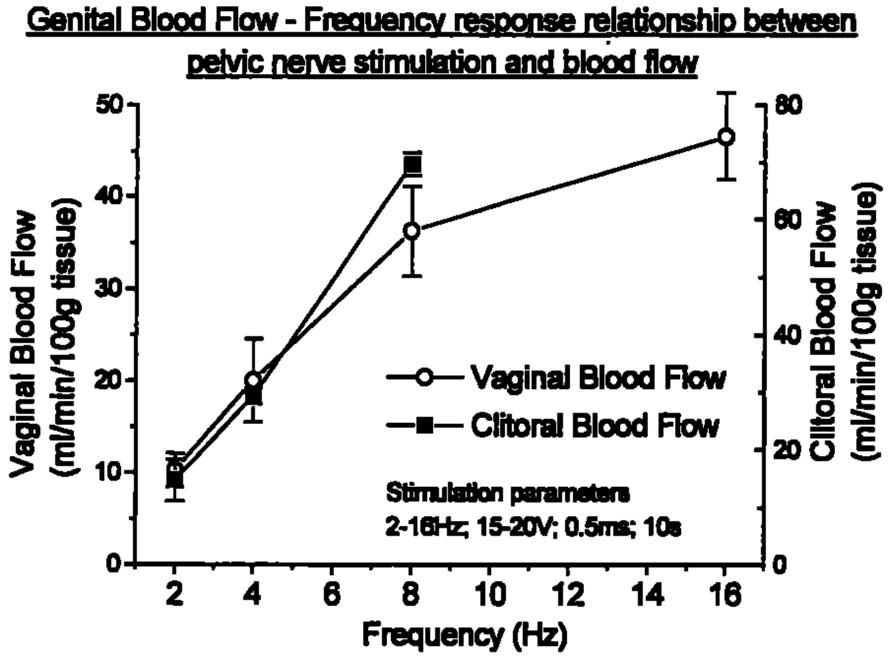
## ABSTRACT

## PHARMACEUTICAL

A method of treating a female suffering from FSD, in particular FSAD, is described. The method comprises delivering to the female an agent that is capable of potentiating cAMP in the sexual genitalia; wherein the agent is in an amount to cause potentiation of cAMP in the sexual genitalia of the female. The agent may be admixed with a pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient.

224 ~~212~~

Figure 1



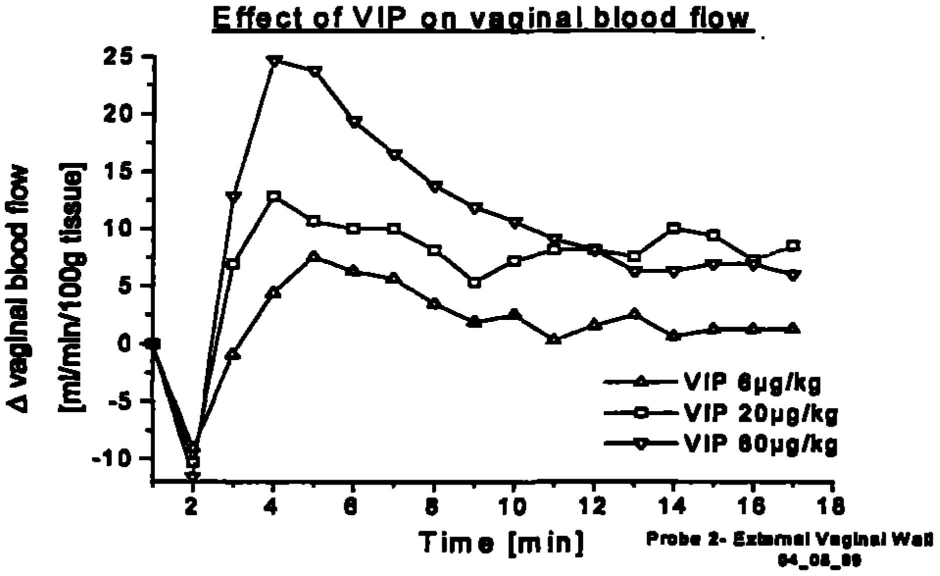
Genital Blood Flow - Frequency response relationship between pelvic nerve stimulation and blood flow

Stimulation parameters
2-16Hz; 15-20V; 0.5ms; 10s

2125

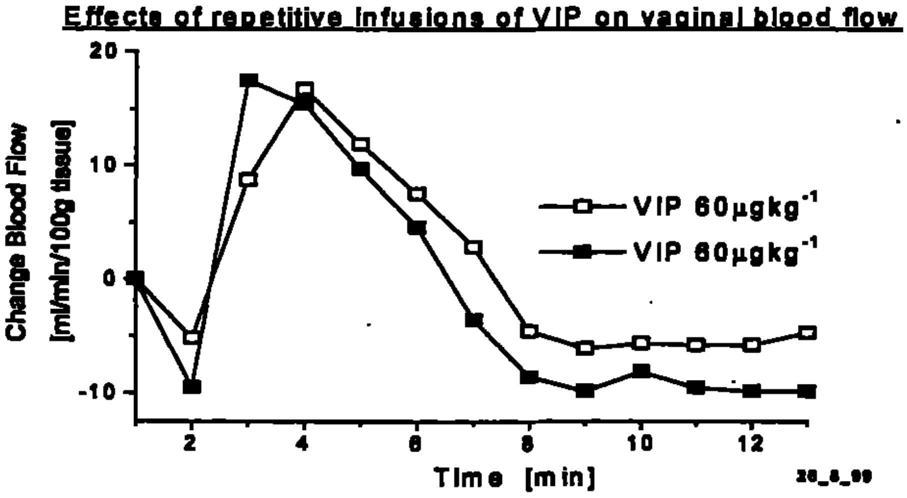
Figure 2

a



Effect of VIP on vaginal blood flow

Probe 2- External Vaginal Wall
04_08_99



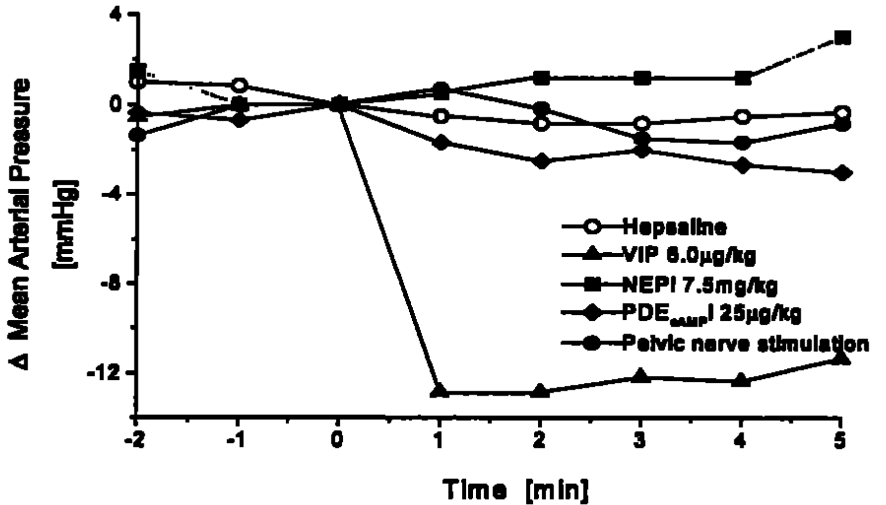
Effects of repetitive infusions of VIP on vaginal blood flow

26_8_99

2b

Figure 3

Effect of VIP, an NEP Inhibitor, a PDE$_{cAMP}$ inhibitor or Pelvic Nerve Stimulation on Mean Arterial Pressure in the Anaesthetised Rabbit

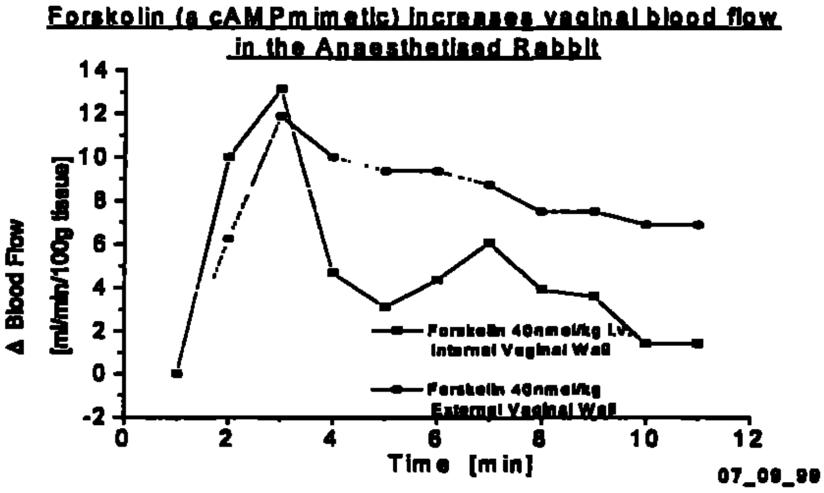


22_10_99

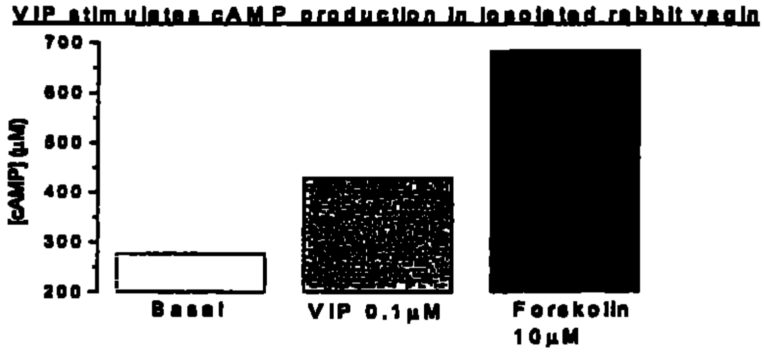
2127

Figure 4

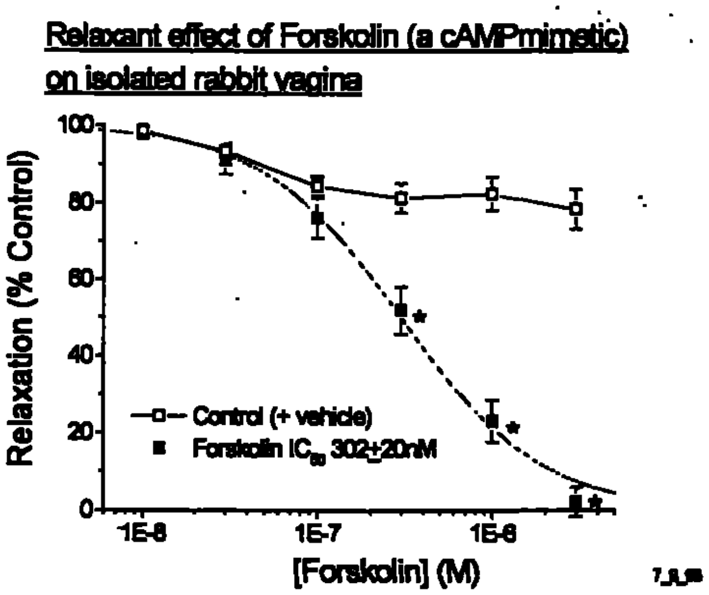
4a



)



4b)



4c)

Figure 5

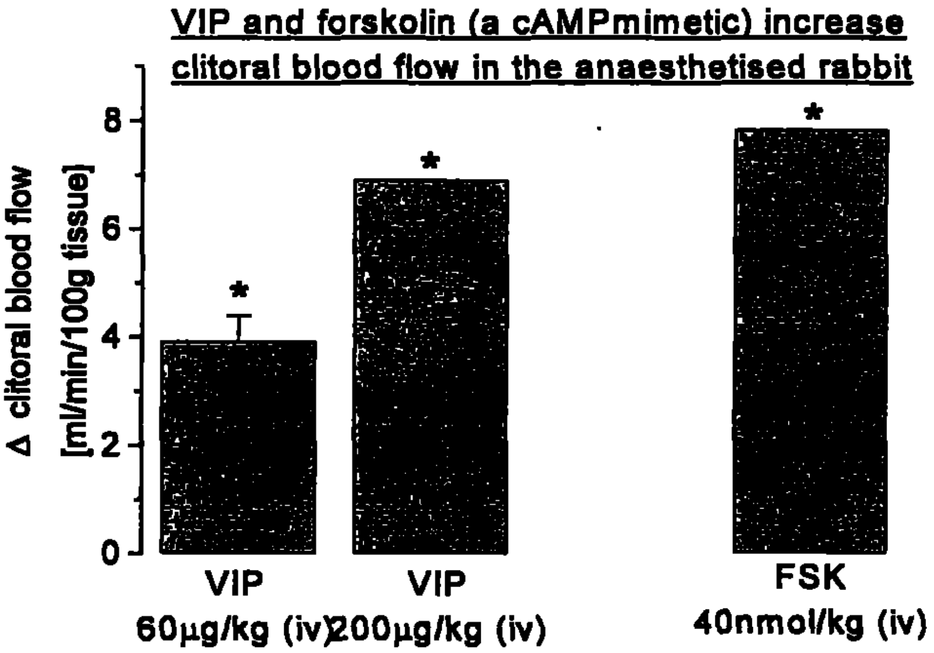

VIP and forskolin (a cAMPmimetic) increase clitoral blood flow in the anaesthetised rabbit
Δ clitoral blood flow
[ml/min/100g tissue]
0
2
4
6
8
*
*
*
VIP
60μg/kg (iv)
VIP
200μg/kg (iv)
FSK
40nmol/kg (iv)

Figure 6

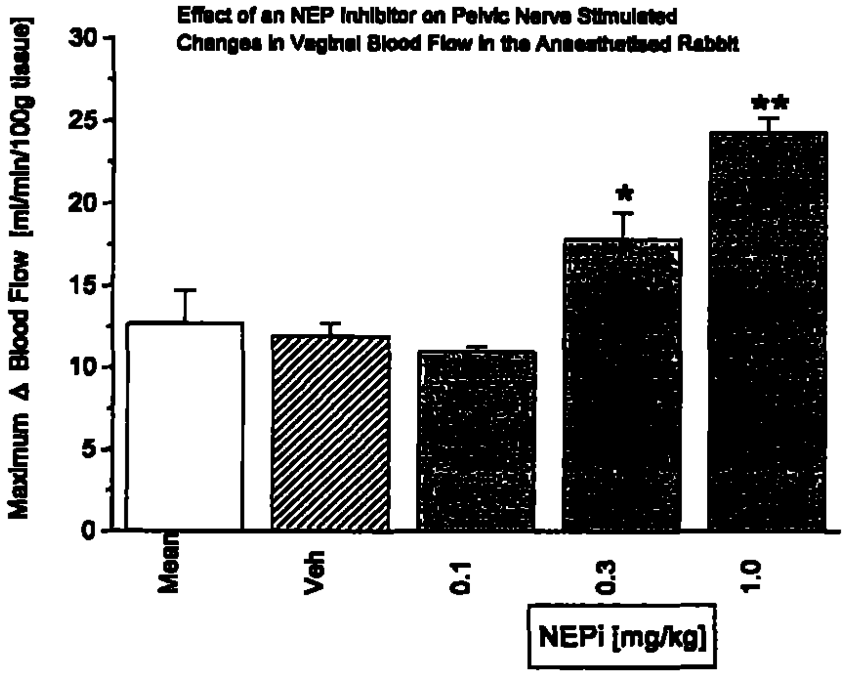
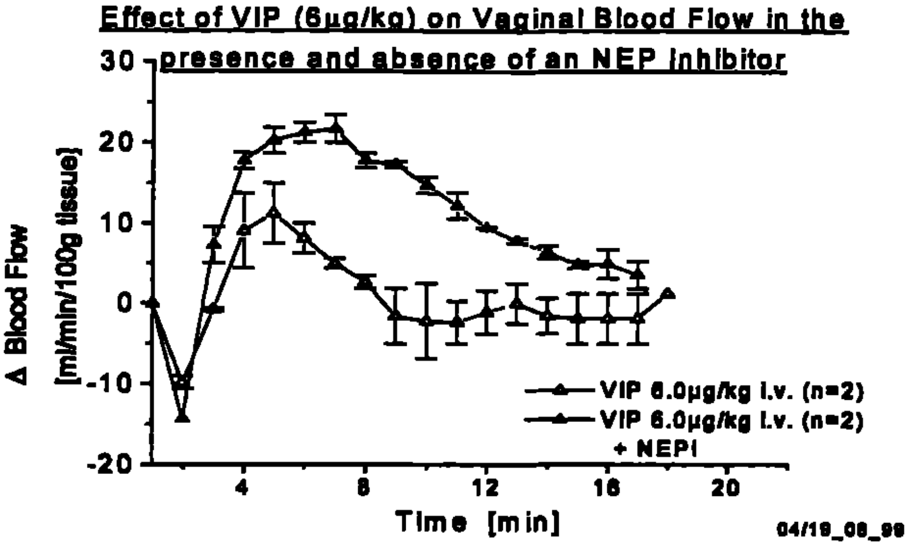
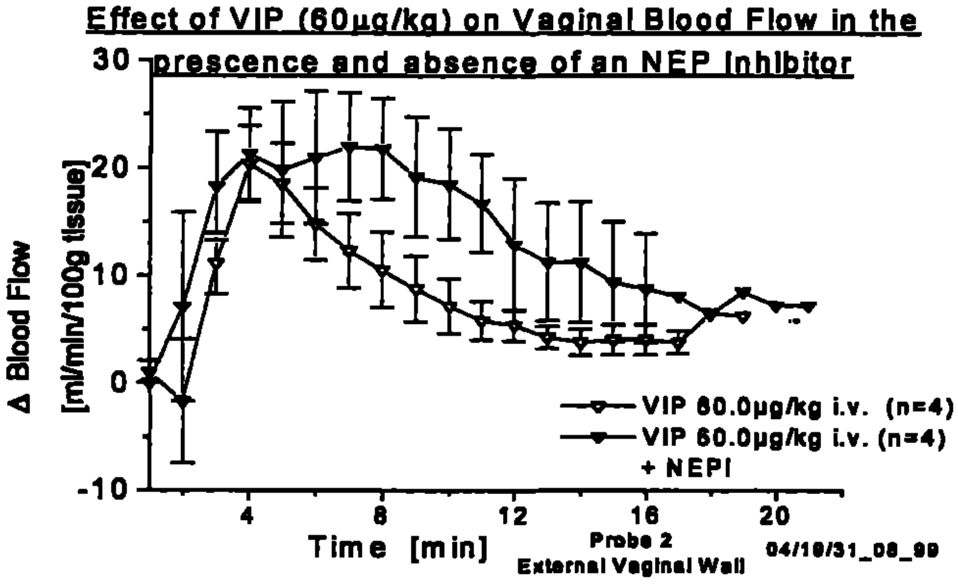

Effect of an NEP Inhibitor on Pelvic Nerve Stimulated Changes in Vaginal Blood Flow in the Anaesthetised Rabbit
Maximum Δ Blood Flow [ml/min/100g tissue]
30
25
20
15
10
5
0
*
**
Mean
Veh
0.1
0.3
1.0
NEPi [mg/kg]

Figure 7

2130





2131

Figure 8

Effect of a PDEcAMP type2 inhibitor on pelvic nerve stimulated increases in vaginal blood flow

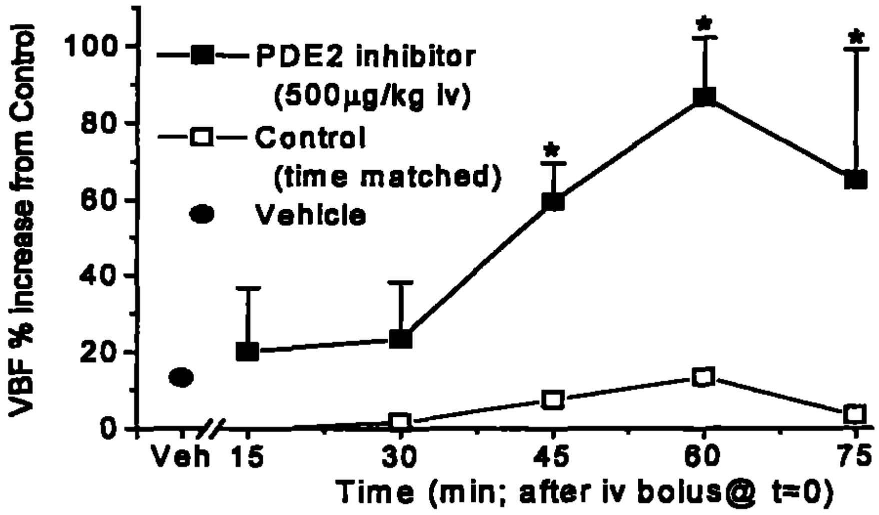


Figure 9

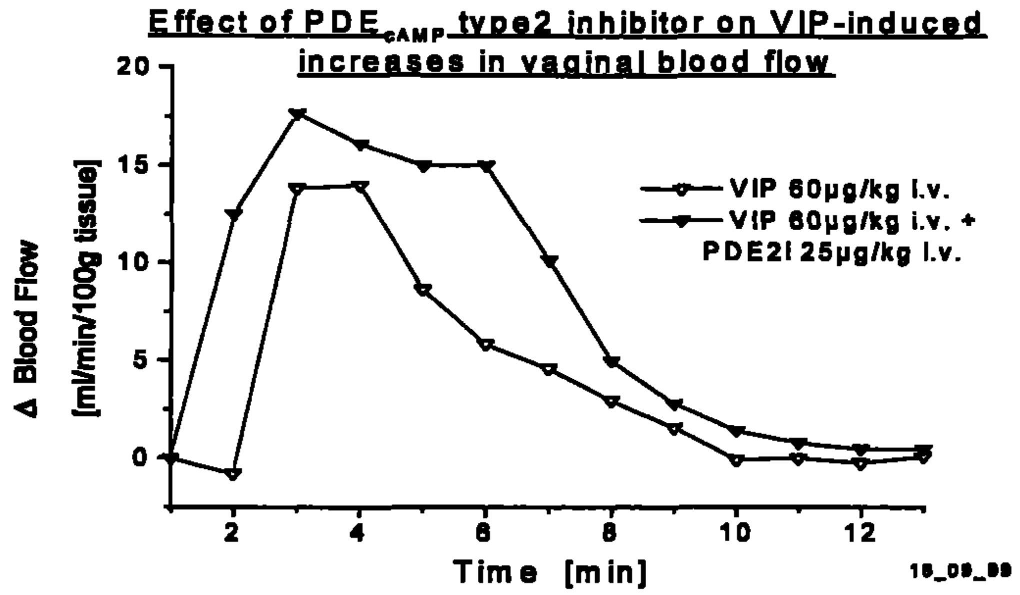
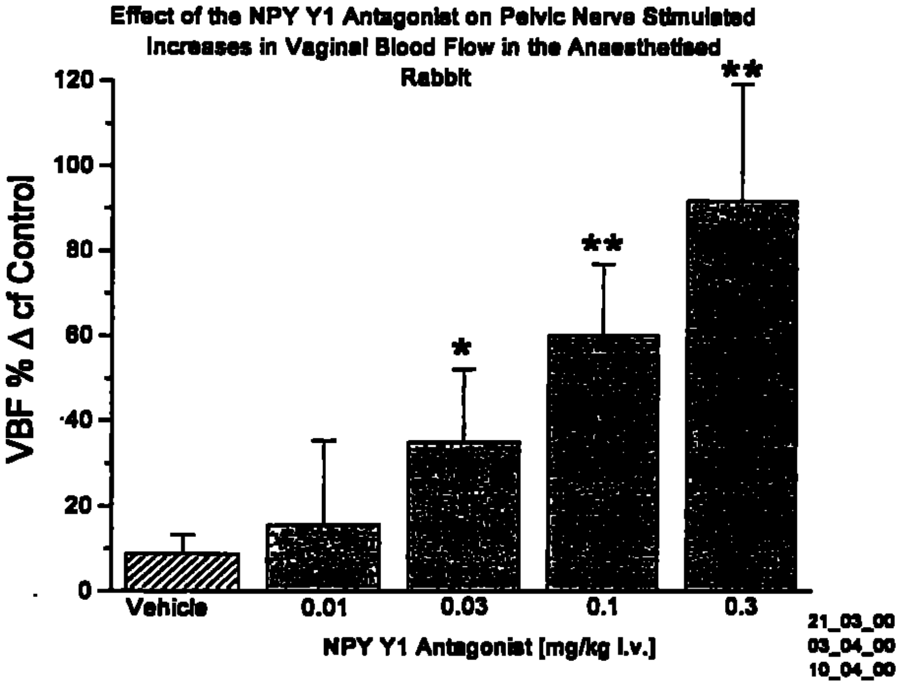
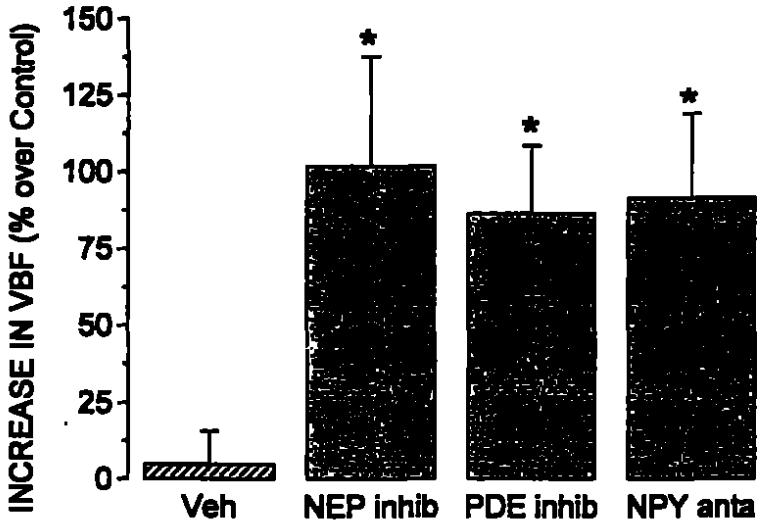

Effect of PDE$_{cAMP}$ type2 inhibitor on VIP-induced increases in vaginal blood flow
Δ Blood Flow [ml/min/100g tissue]
20
15
10
5
0
2
4
6
8
10
12
Time [min]
VIP 60µg/kg i.v.
VIP 60µg/kg i.v. + PDE2I 25µg/kg i.v.
16_09_99

Figure 10


Effect of the NPY Y1 Antagonist on Pelvic Nerve Stimulated Increases in Vaginal Blood Flow in the Anaesthetised Rabbit
VBF % Δ cf Control
0
20
40
60
80
100
120
*
**
**
Vehicle
0.01
0.03
0.1
0.3
NPY Y1 Antagonist [mg/kg i.v.]
21_03_00
03_04_00
10_04_00

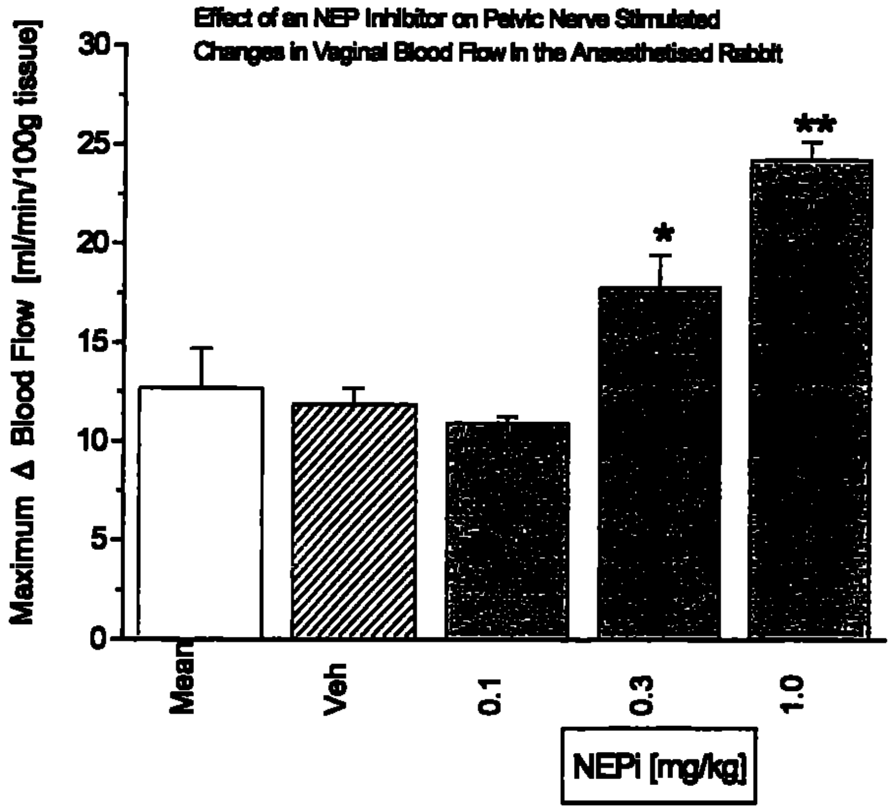
21341

Figure 11



Enhancing cAMP signalling potentiates nerve-mediated increases in vaginal blood flow (VBF) in the rabbit

Figure 12


Effect of an NEP Inhibitor on Pelvic Nerve Stimulated
Changes in Vaginal Blood Flow in the Anaesthetised Rabbit
Maximum Δ Blood Flow [ml/min/100g tissue]
30
25
20
15
10
5
0
*
**
Mean
Veh
0.1
0.3
1.0
NEPi [mg/kg]

2136 ~~2127~~

# COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA DISFUNCION SEXUAL FEMENINA

## AMBITO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un producto farmacéutico que es útil para el tratamiento de la disfunción sexual femenina (FSD), en particular de trastornos de la excitación sexual femenina (FSAD).

La presente invención se refiere también a un procedimiento de tratamiento de la FSD, en particular de la FSAD.

La presente invención se refiere también a ensayos para rastrear compuestos útiles en el tratamiento de la FSD, en particular de la FSAD.

Por conveniencia, se presenta una lista de las abreviaturas que se utilizan en el siguiente texto antes de la sección de reivindicaciones.

## RESPUESTA SEXUAL FEMENINA

La fase de excitación de la respuesta sexual femenina no se distingue fácilmente de la fase de deseo hasta que empiezan a tener lugar cambios fisiológicos en la vagina y clítoris así como en otros órganos sexuales. La excitación y placer sexuales están acompañados de una

combinación de eventos vasculares y neuromusculares que conducen a la congestión del clítoris, labios y pared vaginal, a un aumento de la lubricación vaginal y de la dilatación del lumen vaginal (Levin, 1980, Ottesen, 1983, Levin, 1991, Levin, 1992, Sjoberg, 1992, Wagner, 1992, Schiavi et al., 1995, Masters et al., 1996, Berman et al., 1999).

La congestión vaginal posibilita que tenga lugar la trasudación, y este proceso es responsable del aumento de la lubricación vaginal. La trasudación permite un flujo de plasma a través del epitelio sobre la superficie de la vagina, cuya fuerza motriz es el aumento del flujo sanguíneo en el lecho capilar vaginal durante el estado excitado. Además, la congestión conduce a un aumento de la longitud vaginal y del diámetro luminal, especialmente en los dos tercios distales del canal vaginal. La dilatación luminal de la vagina se debe a una combinación de la relajación del músculo liso de esta pared y la relajación del músculo esquelético de los músculos del suelo pélvico. Algunos trastornos de dolor sexual, como el vaginismo, se piensa que son debidos, al menos en parte, a una inadecuada relajación que evita la dilatación de la vagina, todavía debe determinarse si este es un problema principalmente del músculo liso o del esquelético. (Levin, 1980, Ottesen,

1983, Levin, 1991, Sjoberg, 1992, Wagner, 1992, Schiavi et al., 1995, Master et al., 1996, Berman et al., 1999).

La vasculatura y microvasculatura de la vagina están inervadas por nervios que contienen neuropéptidos y otros candidatos a neurotransmisores. Estos incluyen el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), el neuropéptido Y (NPY), la óxido nítrico sintasa (NOS), la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), (Hoyle et al., 1996). Los péptidos que están presentes en el clítoris se discuten a continuación. La óxido nítrico sintasa, que se localiza a menudo con el VIP, muestra una mayor expresión, inmunológicamente, en las arterias y venas profundas que en los vasos sanguíneos propios (Hoyle et al., 1996).

## DISFUNCION SEXUAL FEMENINA

Se sabe que algunos individuos pueden sufrir disfunción sexual femenina (FSD).

La FSD se define como la dificultad o incapacidad de una mujer para encontrar satisfación en la expresión sexual. La FSD es un término colectivo para varios trastornos sexuales femeninos (Leiblum, 1998, Berman et al., 1999). La mujer puede tener falta de deseo, dificultad con la

excitación o el orgasmo, dolor en el coito o una combinación de estos problemas. Algunos tipos de enfermedades, medicaciones, heridas o problemas psicológicos pueden producir la FSD.

Los estudios que investigan la disfunción sexual en parejas revelan que hasta el 76% de las mujeres padecen disfunción sexual y que el 30-50% de las mujeres de los EE.UU. ha experimentado la FSD.

Los subtipos de la FSD incluyen: trastorno del deseo sexual hipoactivo, trastorno de la excitación sexual femenina, trastornos orgásmicos y trastorno del deseo sexual.

Los tratamientos en desarrollo están dirigidos a tratar subtipos específicos de la FSD, predominantemente los trastornos del deseo y de la excitación.

Las categorías de la FSD se definen mejor por contraste con las fases de la respuesta sexual femenina normal: deseo, excitación y orgasmo (Leiblum, 1998). El deseo o líbido es el motor de la expresión sexual, y sus manifestaciones incluyen a menudo pensamientos sexuales junto con un compañero interesado o al exponerse a otros estímulos sexuales. En contraposición, la excitación sexual es la

respuesta vascular a la estimulación sexual, un componente importante de la cual es la lubricación vaginal y la elongación de la vagina. De esta manera, la excitación sexual, en contraposición con el deseo sexual, es una respuesta relativa al flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal y clitorídeo) y no necesariamente a la sensibilidad. El orgasmo es la liberación de la tensión sexual que ha culminado durante la excitación. Por ello, la FSD aparece típicamente cuando una mujer tiene una respuesa inadecuada o insatisfactoria en cualquiera de estas fases, habitualmente deseo, excitación u orgasmo. Las categorías de la FSD incluyen: trastorno del deseo sexual hipoactivo, trastorno de la excitación sexual, trastornos orgásmicos y trastornos de dolor sexual.

El trastorno del deseo sexual hipoactivo está presente si una mujer no tiene deseo, o tiene poco, de ser sexual, y no tiene pensamientos o fantasías sexuales, o tiene pocos. Este tipo de FSD puede producirse por niveles bajos de testosterona, debidos a la menopausia natural o a la menopausia quirúrgica. Otras causas incluyen enfermedad, medicaciones, fatiga, depresión y ansiedad.

El trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) se caracteriza por una respuesta genital inadecuada a la estimulación sexual. Los genitales (por ejemplo vagina y/o clítoris) no experimentan la congestión que caracteriza a la excitación sexual normal. Las paredes vaginales están poco lubricadas, de modo que el coito es doloroso. Los orgasmos pueden estar imposibilitados. El trastorno de la excitación puede estar producido por una reducción de estrógenos en la menopausia o después de un parto y durante la lactancia, así como por enfermedad, con componentes vasculares como diabetes y aterosclerosis. Otras causas son resultado del tratamiento con agentes diuréticos, antihistamínicos, antidepresivos, por ejemplo SSRI, o antihipertensivos. El FSAD se discute con más detalle a a continuación.

Los trastornos de dolor sexual (que incluyen dispareunia y vaginismo) se caracterizan por dolor como resultado de la penetración y pueden estar causados por medicaciones que reducen la lubricación, endometriosis, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad intestinal inflamatoria o problemas del tracto urinario.

La prevalencia de la FSD es difícil de calibrar debido a que el término cubre varios tipos de problemas, algunos de los cuales son difíciles de medir, y debido a que el interés por tratar la FSD es relativamente reciente. Muchos problemas sexuales de las mujeres están asociados directamente al proceso de envejecimiento femenino o a enfermedades crónicas como diabetes e hipertensión.

Existen amplias variaciones en la incidencia y prevalencia comunicadas de la FSD descritas, explicadas en parte por el uso de criterios de evaluación diferentes, pero la mayoría de los investigadores comunica que una proporción significativa de mujeres por lo demás sanas tiene síntomas de uno o más de los subgrupos FSD. Como ejemplo, los estudios que comparan la disfunción sexual en parejas revelan que el 63% de las mujeres tienen disfunción de la excitación o del orgasmo, comparado con el 40% de los hombres que tienen disfunción eréctil o eyaculatoria (Frank et al., 1978).

Sin embargo, la prevalencia del trastorno de la excitación sexual femenina varía considerablemente de estudio a estudio. En un reciente estudio de National Health and Social Life, el 19% de las mujeres comunicaron dificultades de lubricación, mientras que el 14% de las mujeres pacientes ambulatorios de una clínica ginecológica comunicaron dificultades similares con la lubricación (Rosen et al., 1993).

2143

Varios estudios han informado también acerca de disfunción de la excitación sexual en mujeres diabéticas (hasta un 47%), incluyendo la reducción de la lubricación vaginal (Wincze et al., 1993). No hubo asociación entre neuropatía y disfunción sexual.

Numerosos estudios han mostrado también que entre un 11-48% de mujeres en conjunto pueden tener un deseo sexual reducido con la edad. De forma similar, entre 11-50% de las mujeres comunican problemas con la excitación y la lubricación, y por lo tanto experimentan dolor en el coito. El vaginismo es menos común, afectando aproximadamente al 1% de las mujeres.

Los estudios de mujeres sexualmente experimentadas han detallado que el 5-10% tienen anorgasmia primaria. Otro 10% tiene orgasmos infrecuentes y otro 10% los experimenta inconsistentemente (Spector et al., 1990).

Debido a que la FSD consiste en varios subtipos que expresan síntomas en fases separadas del ciclo de respuesta sexual, no hay una terapia única. El tratamiento actual de la FSD se enfoca principalmente a temas psicológicos y de relación. El tratamiento de la FSD evoluciona gradualmente según se dedican más estudios clínicos y de ciencia básica a la investigación de este problema médico. Las dolencias sexuales femeninas no son todas psicológicas en su patofisiología, especialmente para aquellos individuos que pueden tener un componente de disfunción vasculogénica (por ejemplo FSAD) que contribuye a la dolencia sexual femenina en conjunto. No existen actualmente medicamentos autorizados para el tratamiento de la FSD. La terapia de medicamentos empírica incluye la administración de estrógenos (tópicamente o en forma de una terapia de sustitución hormonal), andrógenos o medicamentos de alteración del ánimo como buspirona o trazodona. Estas opciones de tratamiento a menudo son insatisfactorias debido a la baja eficacia o a efectos secundarios inaceptables.

Puesto que el interés en tratar la FSD farmacológicamente es relativamente reciente, la terapia consiste en lo siguiente: consejo psicológico, lubricantes sexuales sin receta médica y candidatos investigacionales, incluyendo medicamentos aprobados para otras dolencias. Estos medicamentos consisten en agentes hormonales, testosterona o combinaciones de estrógeno y testosterona, y más recientemente, medicamentos vasculares, que se han mostrado eficaces en la disfunción eréctil masculina. Ninguno de estos agentes ha demostrado ser muy eficaz para tratar la

2145

FSD.

## TRASTORNO DE LA EXCITACION SEXUAL FEMENINA (FSAD)

La respuesta de excitación sexual consiste en la vasocongestión de la pelvis, la lubricación vaginal y la expansión y tumefacción de los genitales externos. Su alteración produce una notable tensión y/o dificultades interpersonales. Los estudios que han investigado la disfunción sexual en parejas revelan que existe un gran número de mujeres que sufren disfunción de la excitación sexual, conocida también como trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD).

El manual de diagnóstico y estadística (DSM) IV de la Asociación Psiquiátrica Americana define el trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) como:

> *"una incapacidad persistente o recurrente para alcanzar o mantener hasta la terminación de la actividad sexual una respuesta adecuada de lubricación-tumefacción de la excitación sexual. La alteración produce una notable tensión o dificultades interpersonales."*

2146

El FSAD es un trastorno sexual altamente prevalente que afecta a mujeres pré, peri- y postmenopáusicas (±HRT). Está asociado a trastornos concomitantes como depresión, enfermedades cardiovasculares, diabetes y trastornos UG.

Las consecuencias primarias del FSAD son la falta de congestión/tumefacción, falta de lubricación y falta de sensación genital placentera. Las consecuencias secundarias del FSAD son una reducción del deseo sexual, dolor durante el coito y dificultades para conseguir un orgasmo.

Recientemente se ha hipotetizado que existe una base vascular para al menos una parte de las pacientes con síntomas del FSAD (Goldstein et al., 1998) con datos animales que apoyan esta perspectiva (Park et al., 1997).

Los medicamentos candidatos para el tratamiento del FSAD, en los que se está investigando su eficacia, son principalmente terapias de disfunción eréctil que potencian la circulación en los genitales masculinos. Consisten en dos tipos de formulación: medicación oral o sublingual (apomorfina, fentolamina, sildenafilo), y prostaglandina ($PGE_1$-Alprostadil) que se inyecta o administra transuretralmente en hombres, y tópicamente en los genitales de las mujeres.

2147

La presente invención trata de proporcionar un medio eficaz de tratamiento de la FSD, y en particular del FSAD.

## ASPECTOS DEL SUMARIO DE LA PRESENTE INVENCION

Un descubrimiento básico de la presente invención es la capacidad de tratar a una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD) con el uso de un I:PDE.

Según la presente invención el I:PDE de la presente invención se refiere como "el agente de la presente invención".

El agente de la presente invención puede utilizarse también en combinación con uno o más agentes adicionales farmacéuticamente activos. El agente adicional farmacéuticamente activo, si está presente o se utiliza junto con el agente de la presente invención, puede referirse como un "agente adicional". Uno o más de estos agentes adicionales puede ser uno o más de otro I:PDE, un I:NEP, un I:NPY. Las combinaciones de agentes se discuten más detalladamente a continuación.

El agente adicional de la presente invención es un inhibidor de PDE (I:PDE o PDEi), un I:PDE que hidroliza

2148

cAMP (y opcionalmente cGMP). El término "hidrolizante de cAMP" incluye también que metaboliza y/o descompone cAMP. El término "hidrolizante de cAMP (y opcionalmente de cGMP)" significa que el agente adicional puede ser capaz de hidrolizar cGMP además de cAMP. En este caso, el término "hidrolizar cGMP" incluye también metabolizar y/o descomponer cGMP. Sin embargo, para algunas realizaciones de la presente invención, se comprende que el agente adicional no tiene porqué ser capaz necesariamente de hidrolizar cGMP.

Las referencias generales en la presente a agentes pueden ser aplicables a agentes adicionales así como a agentes de la presente invención.

Según la presente invención, el agente de la presente invención actúa sobre una diana, preferiblemente de forma específica sobre esa diana. Esta diana se refiere a veces como "la diana de la presente invención". Sin embargo, el agente de la presente invención puede actuar sobre uno o más de otras dianas. Estas otras dianas pueden referirse como una "diana adicional". De manera similar, si se utiliza un agente adicional, ese agente adicional puede dirigirse a la misma diana de la presente invención y/o a una diana adicional (que no tiene porqué ser la misma diana adicional sobre la que actúa el agente de la presente invención). Las dianas se describen en la presente. Se comprende que las referencias generales en la presente pueden ser aplicables a las dianas adicionales así como a la diana de la presente invención.

Otro descubrimiento básico de la presente invención es la capacidad de estimular el flujo sanguíneo genital femenino (por ejemplo vaginal o clitórico) con el uso del agente de la presente invención.

En los experimentos de los presentes autores se ha encontrado que el FSAD está asociado a una reducción del flujo sanguíneo genital, en particular una reducción del flujo sanguíneo en la vagina y/o clítoris. Por ello, puede conseguirse el tratamiento de mujeres con FSAD por estimulación del flujo sanguíneo genital con agentes vasoactivos. En los estudios de los presentes autores, se ha mostrado que el cAMP media la vasorrelajación vaginal y clitórica y que el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal y clitórico) puede estimularse/potenciarse por elevación de los niveles de cAMP. Este es otro descubrimiento básico.

A este respecto, nadie ha propuesto anteriormente que el

2150

FSAD pueda tratarse de tal manera, es decir por elevación directa o indirecta de los niveles de cAMP. Además, no hay explicaciones en la técnica que sugieran que el FSAD estaba asociado a una modulación perjudicial de la actividad y/o niveles de cAMP o que el cAMP es responsable de la mediación de la vasorrelajación vaginal y clitorídea. Por ello, la presente invención es aún más sorprendente.

Además, se ha encontrado que utilizando los agentes de la presente invención es posible aumentar la congestión genital y tratar el FSAD, por ejemplo por aumento de la lubricación en la vagina y por aumento de la sensibilidad en vagina y clítoris.

Por ello, en un aspecto amplio, la presente invención se refiere al uso de un potenciador de cAMP para tratar la FSD, en particular el FSAD.

La presente invención es ventajosa porque proporciona un medio para restablecer una respuesta de excitación sexal normal, es decir un aumento del flujo sanguíneo genital que conduce a la congestión vaginal, clitorídea y labial. Esto resultará en un aumento de la lubricación vaginal por trasudación de plasma, un aumento de la flexibilidad vaginal y un aumento de la sensibilidad genital (por

2151

ejemplo vaginal y clitorídea). Por ello, la presente invención proporciona un medio para restablecer, o potenciar, la respuesta de excitación sexual normal.

## ASPECTOS DETALLADOS DE LA PRESENTE INVENCION

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una mujer que sufre FSD, en particular del FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En este caso, la composición (como cualquiera de las demás composiciones mencionadas en la presente) puede estar envasada para uso posterior en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la fabricación de un medicamento (como una composición farmacéutica) para el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, siendo capaz el agente de potenciar cAMP en los genitales de una hembra que sufre FSD, en particular del FSAD, y siendo el citado agente el agente

2152

de la presente invención como se ha definido en la presente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la mujer, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo el citado agente el agente de la presente invención como se ha definido en la presente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo el citado PDE un PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de

2153

cAMP).

Como ejemplo, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar cAMP directa o indirectamente para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto un agente con un resto capaz de afectar la actividad y/o niveles de cAMP, y medir la actividad y/o niveles de cAMP, siendo una potenciación del cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo el citado PDE un PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cAMP).

Como otro ejemplo, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar cAMP directa o indirectamente para tratar la FSD, en particular del FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: poner en contacto un agente con cAMP, y medir la actividad de cAMP, siendo una potenciación del cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo el citado PDE un PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cAMP).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de: (a) realizar el ensayo según la presente invención, (b) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente la actividad de cAMP y (c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo el citado PDE un PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cAMP).

En este aspecto, el agente identificado en la etapa (b) puede modificarse de modo que, por ejemplo, se maximice la actividad y después puede repetirse la etapa (a). Estas etapas pueden repetirse hasta que se alcance la actividad o perfil farmacocinético deseado.

Así, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de (a1) realizar el ensayo según la presente invención, (b1) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente la actividad de cAMP, (b2) modificar uno o más de los citados gentes identificados, (a2) repetir opcionalmente la etapa (a1) y (c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados; y siendo el citado agente un

2155

I:PDE, siendo el citado PDE un PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cAMP).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, por potenciación in vivo de cAMP con un agente, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP en un procedimiento de ensayo in vitro, siendo el procedimiento de ensayo in vitro el procedimiento de ensayo según la presente invención; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo el citado PDE un PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cAMP).

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente cAMP al ensayarlo in vitro mediante el procedimiento de ensayo según la presente invención; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo el citado PDE un PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cAMP).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un modelo animal utilizado para identificar agentes capaces

2156

de tratar la FSD (en particular del FSAD), comprendiendo el citado modelo un animal hembra anestesiado incluyendo los medios para medir cambios en el flujo sanguíneo vaginal y/o clitorídeo del citado animal después de la estimulación del nervio pélvico de éste; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo el citado PDE un PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cAMP).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente cAMP para tratar la FSD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: administrar un agente al modelo animal de la presente invención y medir cualquier potenciación de cAMP y/o cualquier aumento del flujo sanguíneo en la vagina y/o clítoris del citado animal; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo el citado PDE un PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cAMP).

Para facilitar la referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se discuten ahora en los encabezados de sección apropiados. Sin embargo, las explicaciones de cada sección no están limitadas necesariamente a cada sección particular.

2157

## ASPECTOS PREFERIDOS

Preferiblemente el agente de la presente invención es para el tratamiento de FSAD.

Preferiblemente el agente de la presente invención es un mediador de la vasorrelajación genital femenina (por ejemplo vaginal o clitorídea).

En una realización, el agente de la presente invención es preferiblemente para administración oral.

En otra realización, el agente de la presente invención puede ser para administración tópica.

Preferiblemente el agente tiene un efecto potenciador directo sobre cAMP.

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención preferiblemente es un inhibidor, es decir, es capaz de exhibir una función inhibidora.

El agente de la presente invención es un I:PDE (a veces escrito como PDEi).

Para algunas aplicaciones, el agente es preferiblemente un I:PDE1 o I:PDE2 (a veces escritos como I:PDEII o PDEIIi o PDE2i) o I:PDE3 o I:PDE4 o I:PDE7 o I:PDE8, más preferiblemente el agente es un I:PDE2.

Preferiblemente el agente es un I:PDE selectivo.

Preferiblemente el agente es un I:PDEII (a veces escrito como I:PDE2 o I:PDEII o I:PDE2i).

Preferiblemente el agente es un I:PDEII selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente de la presente invención puede administrarse junto con otro agente farmacéuticamente activo. En ese caso la coadministración no tiene porqué hacerse a la vez, sino tan sólo por la misma vía. Un ejemplo de composición de coadministración podría ser una composición que comprende un agente según la presente invención y un agente adicional, pudiendo tener el agente adicional un efecto potenciador directo sobre cAMP. Los ejemplos de combinación se discuten a continuación.

Para algunas aplicaciones, el agente tiene preferiblemente un efecto potenciador indirecto sobre cAMP. Ejemplos de dichos agentes incluyen I:NEP y/o I:NPY. Expresado como alternativa, para algunas aplicaciones el agente no tiene preferiblemente un efecto potenciador directo sobre cAMP. Se comprende que el agente puede tener un efecto potenciador indirecto sobre cAMP al actuar sobre los agentes de actuación directa de origen y localización natural, como los VIP de origen y localización natural.

Para algunas aplicaciones, el agente adicional tiene preferiblemente un efecto potenciador directo sobre cAMP. Ejemplos de dichos agentes adicionales incluyen I:PDE.

Para algunas aplicaciones, el agente adicional es un inhibidor, es decir es capaz de exhibir una función inhibidora.

Para algunas aplicaciones, el agente adicional es un antagonista.

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:PDE (a veces escrito como PDEi).

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:PDE1 o I:PDE2 (a veces escritos como I:PDEII o PDEIIi o I:PDE2i) o I:PDE3 o I:PDE4 o I:PDE7 o

I:PDE8, más preferiblemente el agente es un I:PDE2.

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:PDE selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:PDEII (a veces escrito como I:PDE2 o PDEIIi o PDE2i).

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:PDEII selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:NEP (a veces escrito como NEPi).

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:NEP (a veces escrito como NEPi).

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:NEP selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:NEP en el que el citado NEP es EC 3.4.24.11.

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:NEP selectivo en el que el citado NEP es EC 3.4.24.11.

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:NPY (a veces escrito como NPYi).

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:NPY Y1 o I:NPY Y2 o I:NPY Y5, más preferiblemente el agente es un I:NPY Y1.

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:NPY selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:NPY Y1.

Para algunas aplicaciones el agente adicional es preferiblemente un I:NPY Y1 selectivo.

Para algunas aplicaciones el agente preferiblemente no produce, o es administrado de forma que no lo produzca, una caída prolongada de la presión sanguínea (por ejemplo durante un periodo de aproximadamente 5 minutos o más). En esta realización, si el agente se administra tópicamente,

2162

entonces dicho agente puede tener la capacidad de producir una caída de la presión sanguínea (como si se suministrase por vía intravenosa), siempre que en la aplicación tópica pasen unos niveles mínimos de agente al torrente sanguíneo. Para un agente oral se prefiere que el agente no produzca una caída prolongada de la presión sanguínea.

En un aspecto preferido el agente de la presente invención no produce, o es administrado de forma que no produzca, un gran cambio en el ritmo cardiaco.

## TRATAMIENTO

Se apreciará que todas las referencias al tratamiento en la presente incluyen uno o más de: tratamiento curativo, paliativo o profiláctico. Preferiblemente el término tratamiento incluye al menos tratamiento curativo y/o tratamiento paliativo.

## GENITALES FEMENINOS

El término "genitales femeninos" se utiliza según la definición proporcionada en Anatomy de Gray, C.D. Clemente, 13ª edición americana, a saber:

*"Los órganos genitales consisten en un grupo interno y otro externo. Los órganos internos están situados en la pelvis y consisten en ovarios, conductos uterinos, útero y vagina. Los órganos externos son superficiales respecto al diafragma urogenital y por debajo del arco pélvico. Comprenden el monte de Venus, los labios mayores y menores, el clítoris, el vestíbulo, el bulbo del vestíbulo y las glándulas vestibulares mayores."*

## cAMP ENDOGENO

En una realización altamente preferida, el agente de la presente invención potencia el cAMP endógeno, de modo que potencia los niveles de cAMP endógeno.

En este caso, el término "cAMP endógeno" significa cAMP que se origina por la estimulación sexual (excitación sexual). Por ello, el término no comprende los niveles de cAMP que sean elevados independientemente del impulso sexual.

De esta manera, según la presente invención, se consigue el tratamiento de FSAD por potenciación directa o indirecta de la señalización de cAMP endógeno lo que, a su vez, aumenta el flujo sanguíneo/lubricación vaginal y/o el flujo sanguíneo clitorídeo, potenciando así la respuesta excitatoria sexual natural. De esta manera, el procedimiento de tratamiento de la presente invención restablece o potencia la respuesta excitatoria normal.

En el procedimiento de tratamiento de la presente invención puede conseguirse este resultado mediante el uso de un inhibidor de PDE hidrolizante de cAMP.

Se proporciona un modelo de ensayo animal en la presente. Este modelo de ensayo animal puede utilizarse para determinar aumentos del flujo sanguíneo genital como resultado de la potenciación de cAMP. En este modelo animal se estimula un nervio pélvico, que produce un efecto que imita la fisiología de una respuesta/excitación sexual. En estos experimentos, los agentes según la invención producen un aumento del flujo sanguíneo por encima de los aumentos de control, después de haber estimulado el nervio. En ausencia de estimulación, los agentes no tiene efecto (o es despreciable) en la producción de un aumento del flujo sanguíneo. Típicamente, en estos experimentos se estimula el nervio para obtener un aumento de la línea base del flujo sanguíneo. Después se suministra un agente candidato (o real) al animal sistémica o localmente, tal como por vía intravenosa, tópica u oral. Un aumento del flujo sanguíneo, comparado con los aumentos de control, es indicativo entonces de un agente según la presente invención.

## ESTIMULACION SEXUAL

La presente invención comprende también la administración del agente de la presente invención antes y/o durante la estimulación sexual. En este caso el término "estimulación sexual" puede ser sinónimo del término "excitación sexual". Este aspecto de la presente invención es ventajoso porque proporciona selectividad sistémica. La cascada natural aparece sólo en los genitales y no en otras localizaciones, por ejemplo en el corazón, etc. Por ello sería posible conseguir un efecto selectivo sobre los genitales.

De esta manera, para algunos aspectos de la presente invención es altamente deseable que exista una etapa de estimulación sexual. Se ha encontrado que esta etapa puede proporcionar selectividad sistémica. En este caso, "estimulación sexual" puede ser una o más de: estimulación visual, estimulación física, estimulación auditiva o estimulación de pensamiento.

De esta manera, los agentes de la presente invención se suministran antes o durante la estimulación sexual,

2166

particularmente cuando dichos agentes son de administración oral.

Por ello, para este aspecto preferido, la presente invención proporciona el uso de un agente de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSAD, siendo el agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado medicamento.

Preferiblemente, la presente invención proporciona el uso de un agente de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de FSAF, siendo el agente capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD, siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado medicamento y siendo suministrado el citado medicamento oralmente a la citada hembra.

Además, para este aspecto preferido, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente de la presente invención que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado agente.

Preferiblemente la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSAD, comprendiendo el procedimiento el suministro a la hembra de un agente de la presente invención que es capaz de potenciar cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación de cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, siendo la citada hembra sexualmente estimulada antes o durante la administración del citado agente, y siendo suministrado el citado agente oralmente a la citada hembra.

## POTENCIACION de cAMP

Como se utiliza en la presente con referencia al cAMP, el término "potenciación" incluye cualquiera de: aumento de la eficacia de cAMP, aumento de los niveles de cAMP,

2168

aumento de la actividad de cAMP, reducción del nivel de la degradación de cAMP, reducción del nivel de inhibición de cAMP.

El efecto potenciador puede ser un efecto directo. Un ejemplo de efecto directo sería la sobrerregulación de los niveles de cAMP por un agente que aumenta la expresión de éste.

Como alternativa, el efecto potenciador podría ser un efecto indirecto. Un ejemplo de dicho efecto sería la acción sobre una sustancia que, de otra manera, inhibiría y/o reduciría los niveles y/o actividad de cAMP. Otro ejemplo de dicho efecto sería el aumento de la acción de una sustancia que aumenta la eficacia de cAMP, aumenta los niveles de cAMP, aumenta la actividad de CAMP, reduce el nivel de degradación de cAMP o reduce el nivel de inhibición de cAMP.

Un ejemplo de PcAMP sería I:PDEII.

## Miméticos de cAMP

Para algunos aspectos de la presente invención el agente puede actuar como un mimético de cAMP.

Como se utiliza en la presente, el término "mimético de cAMP" significa un agente que puede actuar de modo similar (es decir tener un perfil y un efecto biológico similares) al cAMP en los genitales sexuales femeninos, y hacerlo mediante uno o más de: aumento de la eficacia de los restos similares a cAMP, aumento de los niveles de los restos similares a cAMP, aumento de la actividad de los restos similares a cAMP, reducción del nivel de degradación de los restos similares a cAMP, reducción del nivel de inhibición de los restos similares a cAMP.

Un ejemplo de mimético de cAMP sería la forscolina. Se ha encontrado que la forscolina aumenta el flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo y puede actuar también como relajante vaginal.

En un aspecto preferido, el mimético de cAMP se administra oralmente.

## ACTIVADOR DE cAMP

Como se utiliza en la presente, el término "activador de cAMP" significa una sustancia que controla o libera cAMP en los genitales sexuales femeninos. El control puede ser directo (por ejempo sobre el mismo cAMP) o indirecto (por ejemplo por activación de cAMP). Para facilitar la referencia se hace referencia a estas sustancias como $A_{cAMP}$.

## DIANA

El término "diana" como se utiliza en la presente con referencia a la presente invención significa cualquier sustancia que sea cAMP, un $A_{cAMP}$, un $I_{cAMP}$ o un $AM_{cAMP}$. Expresado de otra manera, la diana de la presente invención puede referirse como una diana $P_{cAMP}$.

La diana y/o diana adicional de la presente invención puede ser una secuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos que codifica la misma y/o una unidad de expresión responsable de la expresión de la misma y/o un modulador de la misma.

La diana puede ser incluso una combinación de dichas dianas.

## AGENTE

El agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como una $P_{cAMP}$.

El agente (es decir el agente de la presente invención y/o el agente adicional) puede ser una secuencia de aminoácidos o un derivado químico de ésta. La sustancia puede ser incluso un compuesto orgánico u otro compuesto químico. El agente puede incluso ser una secuencia de nucleótidos, que puede ser una secuencia con sentido o una secuencia sin sentido. El agente puede ser incluso un anticuerpo.

De esta manera, el término "agente" incluye, aunque no está limitado a él, un compuesto que puede obtenerse o producirse mediante cualquier fuente adecuada, natural o no.

El agente puede diseñarse u obtenerse a partir de una biblioteca de compuestos que puede comprender péptidos, así como otros componentes tales como moléculas orgánicas pequeñas, como compuestos líder.

Como ejemplo, el agente puede ser una sustancia natural, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos como células o tejidos de bacterias, hongos, o animales (particularmente mamíferos), una molécula orgánica o inorgánica, un agente sintético, un agente semisintético, un mimético estructural o funcional, un péptido, un mimético de péptido, un agente

2172

derivado, un péptido cortado a partir de una proteína entera, o un péptido obtenido sintéticamente (como, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos o por técnicas recombinantes o combinaciones de éstos), un agente recombinante, un anticuerpo, un agente natural o no natural, una proteína de fusión o equivalente de ésta y mutantes, derivados o combinaciones de éstos.

Como se utiliza en la presente, el término "agente" puede ser una entidad simple o puede ser una combinación de agentes.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, como si el agente es un I:PDE, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente dos o más grupos hidrocarburo unidos. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente al menos dos grupos cíclicos, siendo uno de dichos grupos cíclicos una estructura de anillo cíclico condensado. Para algunas aplicaciones, al menos uno de los grupos cíclicos es preferiblemente un grupo heterocíclico. Para algunas aplicaciones, el grupo heterocíclico comprende preferiblemente al menos un N en el anillo. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

2173

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, tal como cuando el agente es un I:NEP, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente un grupo amida (es decir N(H)-C(O)- o incluso -C(O)-N(H)-) y uno o más grupos hidrocarburo. En este caso, el término "grupo hidrocarburo" significa un grupo que comprende al menos C y H y puede comprender opcionalmente uno o más sustituyentes adecuados. Ejemplos de dichos sustituyentes pueden incluir halo, alcoxi, nitro, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de que los sustituyentes sean un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes pueden formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarburo comprende más de un C, estos carbonos no tienen porque estar unidos necesariamente unos a otros. Por ejemplo, al menos dos de los carbonos pueden estar unidos a través de un elemento o grupo adecuado. De esta manera, el grupo hidrocarburo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados resultarán evidentes para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente un grupo cíclico. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente un grupo cíclico unido a otro grupo hidrocarburo por medio de un enlace amida. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

Si el agente es un compuesto orgánico, entonces para algunas aplicaciones, tal como cuando el agente es un I:NPY, ese compuesto orgánico puede comprender típicamente dos o más grupos hidrocarburo unidos. Para algunas aplicaciones, el agente comprende preferiblemente al menos dos grupos cíclicos, siendo opcionalmente uno de dichos grupos cíclicos una estructura de anillo cíclico condensado. Para algunas aplicaciones, al menos uno de los grupos cíclicos es preferiblemente un grupo heterocíclico. Para algunas aplicaciones, el grupo heterocíclico comprende preferiblemente al menos un N en el anillo. Ejemplos de dichos compuestos se presentan en la sección de ejemplos de la presente.

El agente puede contener grupos halo. En este caso, "halo" significa fluoro, cloro, bromo o yodo.

El agente puede contener uno o más grupos alquilo, alcoxi, alquenilo, alquileno o alquenileno, que pueden ser de cadena lineal o ramificada.

El agente puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, como una sal de adición de ácidos o una sal básica o un solvato de éstas, incluyendo un hidrato de éstas. Para una revisión de las sales adecuadas véase Berge

2175

et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19.

Las sales de adición de ácidos adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas y son ejemplos las sales clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, bisulfato, nitrato, fosfato, fosfato ácido, acetato, maleato, fumarato, lactato, tartrato, citrato, gluconato, succinato, sacarato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, para-toluenosulfonato y pamoato.

Las sales básicas adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas y son ejemplos las sales de sodio, potasio, aluminio, calcio, magnesio, zinc y dietanolamina.

Una sal farmaceúticamente aceptable de un agente de la presente invención puede prepararse fácilmente mezclando disoluciones del agente y del ácido o base deseados, según sea apropiado. La sal puede precipitar de la disolución y recogerse por filtración o bien puede recuperarse por evaporación del disolvente.

El agente de la presente invención puede existir en forma polimórfica.

2176

El agente de la presente invención puede contener uno o más átomos de carbono asimétricos y existir por lo tanto en dos o más formas estereoisoméricas. Cuando un agente contiene un grupo alquenilo o alquenileno puede aparecer también isomería cis (E) y trans (Z). La presente invención incluye los estereroisómeros individuales del agente y, cuando es apropiado, las formas tautoméricas individuales de éste, junto con las mezclas de éstas.

La separación de los diastereoisómeros o de los isómeros cis y trans puede conseguirse por técnicas convencionales, por ejemplo mediante cristalización fraccionada, cromatografía o HPLC de una mezcla estereoisomérica del agente o de una sal adecuada o de un derivado de éstos. Un enantiómero individual del agente puede prepararse también a partir del intermedio correspondiente ópticamente puro o por resolución, como por HPLC del correspondiente racemato utilizando un soporte quiral adecuado, o por cristalización fraccionada de las sales diastereoisoméricas formadas por reacción del correspondiente racemato con un ácido o base ópticamente activo, según sea apropiado.

La presente invención incluye también todas las variaciones isotópicas adecuadas del agente o de una sal farmacéuticamente aceptable de éste. Una variación isotópica de un agente de la presente invención o de una sal farmacéuticamente aceptable de éste se define como uno en el que al menos un átomo está reemplazado por un átomo con el mismo número atómico pero con masa atómica diferente de la masa atómica encontrada habitualmente en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse al agente y a las sales farmacéuticamente aceptables de éste, incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro como $^{2}H$, $^{3}H$, $^{13}C$, $^{14}C$, $^{15}N$, $^{17}O$, $^{18}O$, $^{31}P$, $^{32}P$, $^{35}S$, $^{18}F$ y $^{36}Cl$, respectivamente. Ciertas variaciones isotópicas del agente y de las sales farmacéuticamente aceptables de éste, por ejemplo aquellas en las que se incorpora un isótopo radiactivo como $^{3}H$ o $^{14}C$, son útiles en estudios de distribución en tejidos de medicamentos y/o sustratos. Los isótopos tritio, es decir $^{3}H$ y carbono 14, es decir $^{14}C$, son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos como deuterio, es decir $^{2}H$, puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas debidas a una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo un aumento de la semivida in vivo o una reducción de los requerimientos de dosificación, y por lo tanto pueden preferirse en algunas circunstancias. Las variaciones isotópicas del agente de la presente invención y de las sales farmacéuticamente aceptables de éste de esta invención pueden prepararse generalmente mediante procedimientos convencionales utilizando las variaciones isotópicas apropiadas de los reactivos adecuados.

Se apreciará por los expertos en la técnica que el agente de la presente invención puede derivar de un profármaco. Los ejemplos de profármacos incluyen entidades que tienen ciertos grupos protegidos y que pueden no poseer actividad farmacológica como tales pero que pueden administrarse, en ciertos casos, (oral o parenteralmente, por ejemplo) y a continuación metabolizarse en el cuerpo para formar el agente de la presente invención que es farmacológicamente activo.

Se apreciará además que ciertos restos conocidos como "prorrestos", por ejemplo como los descritos en "Design of Prodrugs" de H. Bundgaard, Elsevier, 1985 (cuya descripción se incorpora a la presente como referencia), pueden situarse sobre funcionalidades adecuadas de los agentes. Dichos profármacos se incluyen también en el alcance de la invención.

El $P_{cAMP}$ puede realizar una o más de las siguientes funciones: aumentar directa o indirectamente la eficacia del cAMP, aumentar directa o indirectamente los niveles de cAMP, aumentar directa o indirectamente la actividad de cAMP, reducir directa o indirectamente el nivel de degradación de cAMP o reducir directa o indirectamente el nivel de inhibición de cAMP.

Preferiblemente, el agente de la presente invención aumenta directa o indirectamente los niveles de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

Más preferiblemente, el agente de la presente invención aumenta selectivamente y directa o indirectamente los niveles de cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSAD.

Más preferiblemente, el agente de la presente invención aumenta selectivamente y directa o indirectamente los niveles de cAMP, siendo el citado cAMP, cAMP inducido por excitación sexual.

En un aspecto altamente preferido, el agente de la presente invención aumenta la cantidad relativa de cAMP inducido por excitación sexual.

Para algunas aplicaciones el agente de la presente invención trata selectivamente el FSAD.

2180

En un aspecto, el agente puede inhibir o antagonizar una diana adecuada y, al hacerlo, potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales femeninos. En el texto se ha utilizado el término inhibidor para significar un inhibidor y/o un antagonista.

En otro aspecto, el agente puede activar o agonizar una diana adcuada y, al hacerlo, potencia los niveles de cAMP en los genitales sexuales femeninos. En el texto se han utilizado los términos activador e inhibidor de sobrerregulación para significar un activador y/o un sobrerregulador y/o un agonista.

De esta manera, el agente puede agonizar, antagonista, sobrerregular o inhibir una diana adecuada.

El agente de la presente invención puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, o además, el agente de la presente invención puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

Preferiblemente, el agente puede agonizar selectivamente, antagonizar selectivamente, sobrerregular selectivamente o inhibir selectivamente una diana adecuada.

2181

Preferiblemente, el agente puede agonizar selectivamente, antagonizar selectivamente, sobrerregular selectivamente o inhibir selectivamente una diana selectiva adecuada.

El agente puede ser capaz también de mostrar una o más propiedades funcionales beneficiosas adicionales. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede potenciar cAMP así como potenciar cGMP.

Para algunas aplicaciones (tal como para administración tópica), el agente puede mostrar también una acción inhibidora de ACE (enzima conversora de angiotensina). Se presenta un ensayo de ACE en la sección experimental de la presente. Para algunas aplicaciones (tal como con tipos particulares de paciente), dichos agentes (es decir aquellos que muestran acción inhibidora de ACE) pueden no ser adecuados para administración oral.

Para algunas aplicaciones el agente puede mostrar también una acción inhibidora de ECE (enzima conversora de endotelio). Los ensayos de ECE son bien conocidos en la técnica.

## COMBINACIONES FARMACEUTICAS

Puede utilizarse el agente de la presente invención en combinación con uno o más de otros agentes farmacéuticamente activos, como un $P_{cGMP}$ (como un inhibidor de fosfodiesterasa de tipo 5, por ejemplo sildenafilo, o un donante de óxido nítrico, o un precursor de óxido nítrico, por ejemplo L-arginina o inhibidores de arginasa) y/o un compuesto farmacéutico de acción central (por ejemplo un agonista del receptor de dopamina como apomorfina o un agonista del receptor de dopamina D2, como PNU-95666 o un agonista del receptor de melanocortina como melanotán II). Las explicaciones sobre el uso de apomorfina como compuesto farmacéutico pueden encontrarse en el documento US-A-5945117. En ese documento particular se suministra la apomorfina por vía sublingual. Además, o como alternativa, el agente puede utilizarse en combinación con uno o más de: inhibidor de PDE5 (por ejemplo sildenafilo, vardenafilo (Bayer BA 38-9456) e IC351 (Cialis, Icos Lilly)), uno o más de un donante de óxido nítrico (por ejemplo NMI-921), uno o más de un agonista del receptor de dopamina (por ejemplo apomorfina, Uprima, Ixsene), uno o más de una amina heterocíclica como las descritas general y específicamente en el documento WO 00/40226, en particular los ejemplos número 7, 8 y 9, uno o más de un agonista del receptor de melanocortina (por ejemplo Melanotón II o PT14), uno o más de un abridor de canal de

2183

potasio (por ejemplo un abridor de canal $K_{ATP}$ (por ejemplo minoxidil, nicorandil)) y/o un abridor de canal de potasio activado por calcio (por ejemplo BMS-204352), uno o más de un antagonista del adrenoceptor α1 (por ejemplo fentolamina, Vasofem, Vasomax), uno o más de un agonista del receptor de VIP o de un análogo de VIP (por ejemplo Ro-125-1553) o un fragmento de VIP, uno o más de un antagonista del adrenoceptor α1 en combinación con VIP (por ejemplo Invicorp, Aviptadil), uno o más de un antagonista del adrenoceptor α2 (por ejemplo yohimbina), uno o más de un estrógeno, estrógeno y medroxiprogesterona o acetato de medroxiprogesterona (MPA) o un estrógeno y un agente de terapia de sustitución de la hormona metiltestosterona (por ejemplo HRT, especialmente Premarin, Cenestin, Oestrofeminal, Equin, Estrace, Estrofem, Elleste Solo, Estring, Eastradem, Eastraderm TTS, Eastraderm Matrix, Dermestil, Premphase, Prempro, Prempak, Premique, Estratest, Estratest HS, Tibolone), uno o más de un agente de sustitución de la testosterona (incluido DHEA (deshidroandrostendiona), testosterona (Tostrelle) o un implante de testosterona (Organon)), uno o más de un agente de testosterona/estradiol, uno o más de un agonista de estrógeno, por ejemplo Lasofoxifene, uno o más de un agonista o antagonista del receptor de serotonina (por ejemplo agonistas y antagonistas del receptor de 5HT1A, éste). Sin embargo, para algunas realizaciones, el agente de la presente invención puede coadministrarse con VIP o con un análogo de éste o con un fragmento de éste.

En un aspecto altamente preferido, no se administra VIP o un análogo de éste o un fragmento de éste. Esto es debido a que ha habido informes de que las infusiones de VIP conducen a efectos cardiovasculares adversos significativos, como aumentos del ritmo cardiaco y reducción de la presión sanguínea arterial diastólica (Ottesen 1983, 1987, 1995).

Además, aunque Ottesen y colaboradores han demostrado que VIP induce aumentos en el flujo sanguíneo vaginal y en la lubricación en voluntarias sanas, el mecanismo por el cual VIP ejerce sus efectos no está claro. En la bibliografía, existe una serie de ejemplos de señalización de VIP mediante distintos sistemas de segundo mensajero, por ejemplo cGMP/guanilato ciclasa (Ashur-Fabian, 1999), monóxido de carbono (CO)/hemo oxigenasa (Fan et al., 1998) y cAMP/adenilato ciclasa (Foda, 1995, Schoeffter, 1985, Gu, 1992). Esto se ejemplifica en un informe reciente que describe cómo pueden explicarse los efectos vasorrelajantes de VIP en la arteria uterina por la liberación de óxido nítrico (Jovanovic, 1998). De nuevo, existen también evidencias de modulación de VIP por óxido nítrico (NO)/cGMP en la función urogenital masculina (Kim, 1994).

Además, se ha informado en la bibliografía de que VIP no tiene efectos sobre los niveles de cAMP en cultivos de células de músculo liso vaginal (véase Traish, A., Moreland, R.B., Huang, Y., et al. (1999). Development of human and rabbit vaginal smooth muscle cell cultures: Effects of vasoactive agents on intracellular levels of cyclic nucleotides. *Mol. Cell. Biol. Res. Comm.*, **2**, 131-137).

Además, en estudios de seguimiento, Ottesen y colaboradores (véase Palle, Bredkjaer, Ottesen y Fahrenkrug, 1990 Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, vol 17, 61-68) informan de que el efecto de VIP sobre el flujo sanguíneo vaginal, independientemente de la vía de administración, es parte de un efecto vasodilatador sistémico más que de una respuesta local. Además, informan de una serie de efectos secundarios vasculares asociados a VIP, a saber, sofocos, hipotensión y taquicardia.

## Valores de $K_i$

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente

2186

invención (y opcionalmente el agente adicional opcional) tiene preferiblemente un valor de $K_i$ inferior a aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

Valores de $K_b$

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención (y opcionalmente el agente adicional opcional) tiene preferiblemente un valor de $K_b$ menor de aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

## Valores de $K_a$

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención (y opcionalmente el agente adicional opcional) tiene preferiblemente un valor de $K_a$ inferior a aproximadamente 100 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 75 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 50 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 25 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 20 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 15 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 10 nM, preferiblemente inferior a aproximadamente 5 nM.

## FARMACOCINETICA

Para algunas realizaciones de la presente invención, los agentes de la presente invención (y opcionalmente el agente adicional opcional, por ejemplo I:NEP) tienen preferiblemente un log D de -2 a +4, más preferiblemente de -1 a +2. El log D puede determinarse por procedimientos estándar conocidos en la técnica como los descritos en J. Pharm. Pharmacol. 1990, 42:144.

Además, o como alternativa, para algunas realizaciones los

2188

agentes de la presente invención (y opcionalmente el agente adicional opcional, por ejemplo I:NEP) tienen preferiblemente un flujo de células caco-2 superior a 2 x $10^{-6}cm^{-1}$, más preferiblemente superior a 5 x $10^{-6}cm^{-1}$. El valor de flujo de células caco puede determinarse por procedimientos estándar conocidos en la técnica como los descritos en J. Pharm. Sci. 79, 7, p595-600, (1990), y Pharm. Res., vol.14, n°6 (1997).

## SELECTIVIDAD

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención (y opcionalmente el agente adicional opcional) tiene preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 100 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 150 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 200 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 250 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 300 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 350 veces hacia la diana deseada.

Para algunas aplicaciones, el agente de la presente invención (y opcionalmente el agente adicional opcional) tiene preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 400 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 500 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 600 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 700 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 800 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 900 veces hacia la diana deseada, preferiblemente una selectividad de al menos aproximadamente 1000 veces hacia la diana deseada.

## PROCEDIMIENTOS QUIMICOS DE SINTESIS

Típicamente el agente se preparará mediante técnicas químicas de síntesis.

El agente o diana o variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos de éste pueden producirse utilizando procedimientos químicos para sintetizar el agente por

2190

entero o en parte. Por ejemplo, pueden sintetizarse los péptidos por técnicas de fase sólida, separarse de la resina y purificarse por cromatografía líquida de alta resolución (por ejemplo Creighton (1983) Proteins Structure and Molecular Principles, WH Freeman and Co., Nueva York, NY). La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse por análisis o secuenciación de aminoácidos (por ejemplo el procedimiento de degradación de Edman, Creighton, *supra*).

La síntesis directa del agente o variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos de éste puede llevarse a cabo utilizando diversas técnicas en fase sólida (Roberge J.Y., et al., (1995) Science 269: 202-204) y puede conseguirse la síntesis automatizada, por ejemplo utilizando el Sintetizador de péptidos ABI 43 1 A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Además, la secuencia de aminoácidos que comprende el agente o cualquier parte de éste, puede alterarse durante la síntesis directa y/o combinarse utilizando procedimientos químicos con una secuencia de otras subunidades, o cualquier parte de ésta, para producir un agente o diana variante como, por ejemplo, una variante PDE.

2191

En una realización alternativa de la invención, la secuencia de codificación de la diana, del agente o de variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos de éste puede sintetizarse, en todo o en parte, utilizando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers, M.H. et al., (1980) Nuc Acids Symp Ser 215-23, Horn T. et al, (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

## MIMETICO

Como se utiliza en la presente, el término "mimético" se refiere a cualquier compuesto químico que incluye, aunque no está limitado a ellos, un péptido, polipéptido, anticuerpo u otro compuesto químico orgánico que tiene la misma actividad o efecto cualitativo que el agente de referencia respecto de una diana.

## DERIVADO QUIMICO

El término "derivado" o "derivatizado", como se utiliza en la presente, incluye la modificación química de un agente. Un ejemplo de dichas modificaciones químicas sería el reemplazamiento de hidrógeno por un grupo halo, un grupo alquilo, un grupo acilo o un grupo amino.

2192

## MODIFICACION QUIMICA

En una realización de la presente invención el agente puede ser un agente modificado químicamente.

La modificación química de un agente puede estimular o reducir la interacción de puente de hidrógeno, la interacción de cargas, la interacción hidrofóbica, la interaccion de Van der Waals o la interacción de dipolos entre el agente y la diana.

En un aspecto, el agente identificado puede actuar como un modelo (por ejemplo un molde) para el desarrollo de otros compuestos.

## PROCEDIMIENTOS RECOMBINANTES

Típicamente la diana para uso en el ensayo de la presente invención puede prepararse por técnicas de DNA recombinante.

## POTENCIACION DE cGMP

Como se utiliza en la presente con referencia al cGMP, el término "potenciar" incluye uno o más de: aumento de la eficacia del cGMP, aumento de los niveles de cGMP, aumento de la actividad de cGMP, reducción del nivel de degradación de cGMP, reducción del nivel de inhibición de cGMP.

El efecto potenciador puede ser un efecto directo. Como alternativa, podría ser un efecto secundario y/o un efecto cadena abajo.

En este caso, el agente que potencia el cGMP actúa preferiblemente como un $I_{cGMP}$ y/o un $AM_{cGMP}$, teniendo el modulador de cGMP un efecto adverso sobre cGMP, de modo que el agente reduce y/o elimina y/o enmascara y/o desvía el efecto perjudicial del $I_{cGMP}$ y/o del $AM_{cGMP}$ hacia cGMP.

Por ello, la presente invención comprende una combinación de uno o más $I:I_{cAMP}$ y uno o más $I:I_{cGMP}$.

### $I_{cAMP}$ Y/O $AM_{cAMP}$

Se ha mostrado que el cAMP media el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo), y que estimulando la señalización de cAMP se puede estimular el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal y clitorídeo) en un modelo animal. Así, un agente que sobrerregula/estimula la vasorrelajación mediada por cAMP será eficaz en el tratamiento de FSAD. Para facilitar la referencia, nos referimos a estas sustancias como $I_{cAMP}$ y/o $AM_{cAMP}$. En este caso, los $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ tienen un efecto adverso sobre los niveles de actividad de cAMP.

Por ello, el agente puede ser uno o más de: un I:$I_{cAMP}$ y/o un I:$AM_{cAMP}$.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

Los ejemplos de $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ incluyen uno o más PDE y opcionalmente dianas adicionales como NPY y NEP, o cualquier componente asociado a éstos. El componente asociado puede ser, por ejemplo, un receptor y/o un cofactor.

De esta manera, el agente I:$PDE_{cAMP}$ puede utilizarse opcionalmente conjuntamente con uno o más de: un I:NPY (a veces escrito como NPYi), un NPY $Y_n$ (a veces escrito como NPY $Y_n$i) e I:NEP.

De manera similar, el agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

## I:$I_{cAMP}$ Y/O I:$AM_{cAMP}$

Según la presente invención, se ha encontrado que es posible tratar y/o prevenir FSAD utilizando un agente que reduce y/o elimina y/o enmascara y/o desvía y/o previene el efecto perjudicial de $I_{cAMP}$ y $AM_{cAMP}$ hacia cAMP. El agente puede incluso restablecer los niveles de cAMP que habían reducido el $I_{cAMP}$ y el $AM_{cAMP}$. En este caso, el I:$I_{cAMP}$ e I:$AM_{cAMP}$ previenen o reducen el efecto adverso sobre los niveles de actividad del cAMP.

De esta manera, en un aspecto preferido, el agente es un I:$I_{cAMP}$ y/o un I:$AM_{cAMP}$, teniendo el $AM_{cAMP}$ un efecto perjudicial sobre $AM_{cAMP}$.

## $A_{cAMP}$

Según la presente invención, se ha encontrado que una de las causas importantes de FSAD es debida a los bajos niveles o a la baja actividad de cAMP en los genitales femeninos.

Por ello, el agente puede ser un U:$A_{cAMP}$.

De esta manera, el agente de la presente invención puede ser capaz de actuar como y/o puede utilizarse conjuntamente con uno o más de: A:AC, A:VIPr, A:$VIP_n$, I:I:VIPr o I:I:$VIP_n$.

El agente puede ser una entidad simple que es capaz de exhibir dos o más de estas propiedades. Como alternativa, el agente puede ser una combinación de agentes que son capaces de exhibir una o más de estas propiedades.

### U:$A_{cAMP}$

En otro aspecto, la diana es preferiblemente un componente que aumenta el nivel de cAMP. Por ello, el agente puede ser un U:AC.

De esta manera, como ejemplo, el agente de la presente invención puede ser capaz de actuar como y/o puede utilizarse conjuntamente con uno o más de: U:$A_{cAMP}$, A:AC, A:VIPr, A:$VIP_n$, I:I:VIPr o I:I:$VIP_n$.
la diana puede ser el cAMP mismo o AC o VIP (o combinaciones de éstos).

Como ejemplo, la diana puede ser cAMP mismo o AC o VIP (o combinaciones de éstos).

## COMBINACION DE I:I$_{cAMP}$ Y/O I:M$_{cAMP}$ Y/O U:A$_{cAMP}$

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede ser una combinación de potenciadores de cAMP. Como ejemplo, el agente de la presente invención puede ser dos o más de:

I:PDE$_{cAMP}$
I:PDEn$_{cAMP}$
I:NPY
I:NPY Y$_n$
I:NEP
U:A$_{cAMP}$
A:AC
A:VIPr
A:VIP$_a$
I:I:VIPr
I:I:VIP$_n$
mimético de cAMP

## INHIBIDOR

El término "inhibidor", como se utiliza en la presente con

2198

respecto al agente de la presente invención, significa un agente que puede reducir y/o eliminar y/o enmascarar y/o evitar la acción perjudicial de un $I_{cAMP}$ y/o un $M_{cAMP}$ hacia cAMP. El inhibidor puede actuar como un antagonista. Un ejemplo de un antagonista sería I:NPY si se utiliza como agente adicional.

## ACTIVADOR

El término "activador", como se utiliza en la presente con respecto del agente de la presente invención, significa un agente que puede aumentar y/o producir y/o desenmascarar y/o elevar y/o asegurar la acción de cAMP y/o un $A_{cAMP}$. El activador puede actuar como un agonista.

## OTROS COMPONENTES ACTIVOS

En otro aspecto, el agente de la presente invención puede estar en combinación con uno o más de otros compuestos activos, tal como uno o más agentes capaces de potenciar cGMP.

## SECUENCIA DE AMINOACIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "proteína".

La secuencia de aminoácidos puede prepararse aislada de una fuente adecuada, o puede prepararse sintéticamente o puede prepararse mediante el uso de técnicas de DNA recombinante.

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de aminoácidos que es capaz de actuar como una diana en un ensayo para la identificación de uno o más agentes y/o derivados de éstos capaces de afectar a la secuencia de aminoácidos a fin de potenciar el cAMP para tratar FSAD.

## SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS

Como se utiliza en la presente, el término "secuencia de nucleótidos" es sinónimo del término "polinucleótido".

La secuencia de nucleótidos puede ser DNA o RNA de origen genómico, o sintético o recombinante. La secuencia de nucleótidos puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, representando la cadena con sentido o sin sentido o combinaciones de éstas.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente DNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos está preparada preferiblemente mediante el uso de técnicas de DNA recombinante (por ejemplo DNA recombinante).

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos es preferiblemente cDNA.

Para algunas aplicaciones la secuencia de nucleótidos puede ser preferiblemente la misma que la forma de origen natural para este aspecto.

En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una sustancia capaz de actuar como una diana en un ensayo (como un ensayo de dos híbridos de levadura) para la identificación de uno o más agentes y/o derivados de éstos capaces de afectar a la sustancia a fin de potenciar el cAMP para tratar FSAD.

Un experto en la técnica comprenderá que numerosas secuencias diferentes de nucleótidos pueden codificar las dianas como resultado de la degeneración del código genético. Además, se comprenderá que los expertos puedan

2201

preparar, utlizando técnicas de rutina, sustituciones de nucleótidos que no afecten sustancialmente a la actividad codificada por la secuencia de nucleótidos de la presente invención para reflejar el uso del codon de cualquier organismo huésped en el que se exprese la diana de la presente invención. De esta manera, los términos "variante", "homólogo" o "derivado", en relación con la secuencia de nucleótidos descrita en los listados de secuencias adjuntos, incluyen cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazamiento de, deleción de o adición de uno (o más) ácidos nucleicos de la secuencia o a la secuencia siempre que la secuencia de nucleótidos resultante codifique una diana funcional según la presente invención (o incluso un agente según la presente invención si el citado agente comprende una secuencia de nucleótidos o una secuencia de aminoácidos).

Como se ha indicado anteriormente con respecto a la homología de secuencia, existe preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90% de homología con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente. Más preferiblemente, existe al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 98% de homología. Las comparaciones de homología de nucleótidos pueden realizarse

2202

como se ha descrito anteriormente. Un programa de comparación de secuencia preferido es el programa GCG Wisconsin Bestfit descrito anteriormente. La matriz de puntuación por defecto tiene un valor de correspondencia de 10 para cada nucleótido idéntico y -9 para cada desparejamiento. La penalización por creación de un hueco por defecto es -50 y la penalización por extensión de un hueco por defecto es -3 para cada nucleótido.

La presente invención comprende también secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias presentadas en la presente, o con cualquier variante, fragmento o derivado de éstas, o con el complemento de cualquiera de las anteriores. Las secuencias de nucleótidos son preferiblemente de al menos 15 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de al menos 20, 30, 40 ó 50 nucleótidos de longitud. Estas secuencias podrían utilizarse como sondas, tal como en un estuche de diagnóstico.

## VARIANTES/HOMOLOGOS/DERIVADOS

Además de las secuencias de aminoácidos y de las secuencias de nucleótidos específicas mencionadas en la presente, la presente invención comprende también el uso de variantes, homólogos y derivados de éstas. En este caso, el término "homología" puede igualarse a "identidad".

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos un 75, 85 ó 90% idéntica, preferiblemente al menos un 95 ó 98% idéntica. En particular, la homología debería considerarse con respecto a aquellas regiones de la secuencia conocidas por ser esenciales para una actividad. Aunque la homología puede considerarse también en términos de similitud (es decir residuos de aminoácidos con propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología pueden realizarse manualmente, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencia disponibles fácilmente. Estos programas de ordenador comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina un alineamiento "sin huecos". Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se realizan sólo sobre un número relativamente pequeño de residuos.

Aunque este es un procedimiento muy simple y consistente, no consigue tener en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o una deleción producirá que los siguientes residuos de aminoácidos estén fuera de la alineación, dando como resultado potencial una gran reducción del % de homología cuando se realiza un alineamiento global. Consiguientemente, la mayoría de los procedimientos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta las posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente la puntuación general de homología. Esto se consigue insertando "huecos" en el alineamiento de secuencia para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan "penalizaciones de huecos" a cada hueco que aparece en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una secuencia de aminoácidos con tan pocos huecos como sea posible, lo que refleja una mayor

2205

relación entre las dos secuencias comparadas, conseguirá una mayor puntuación que una con muchos huecos. Los "costes de huecos afines" que se utilizan típicamente, cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco, y una penalización menor por cada residuo posterior al hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más habitualmente utilizado. Las penalizaciones por huecos mayores darán lugar por supuesto a alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se utiliza dicho software para comparaciones de secuencia. Por ejemplo, al utilizar el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase a continuación) la penalización por hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

El cálculo del máximo % de homología requiere por lo tanto primeramente la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa de ordenador adecuado para llevar a vabo dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, EE.UU., Devereux, et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencias incluyen,

2206

aunque no están limitados a ellos, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999, ibidem, capítulo 18), FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación GENEWORKS. Ambos BLAST y FASTA están disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel et al., 1999, ibidem, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit. Una nueva herramienta llamada BLAST 2 Sequences está también disponible para comparar secuencias de proteínas y nucleótidos (véanse FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50, FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el propio proceso de alineamiento típicamente no está basado en la comparación de pares todo-o-nada. En lugar de eso, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similitud graduada que asigna puntuaciones a cada comparación emparejada basada en la similitud química o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz utilizada habitualmente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el conjunto BLAST de programas. El programa GCG Wisconsin utiliza generalmente los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos habituales si se suministra (véase el manual del usuario para más detalles). Se prefiere utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz por defecto, como BLOSUM62.

Una vez el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software realiza esto típicamente como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

Las secuencias pueden tener también deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una sustancia de funcionalidad equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden realizarse sobre la base de similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia, y/o naturaleza anfipática de los residuos siempre y cuando se conserve la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos negativamente cargados incluyen ácido aspártico y ácido glutámico, los aminoácidos positivamente cargados incluyen lisina y arginina, y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados con valores de hidrofilia similar incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Las sustituciones conservativas pueden realizarse, por ejemplo, según la tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna, y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna, pueden sustituirse unos a otros.

| | | |
|---|---|---|
| ALIFATICO | No polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar sin carga | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar cargado | D E |
| | | K R |
| AROMATICO | | H F W Y |

La presente invención comprende también que pueda ocurrir la sustitución homóloga (sustitución y reemplazamiento se utilizan ambos en la presente para significar el intercambio de un residuo de aminoácido existente por un residuo alternativo), es decir la sustitución de similar por similar, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También puede darse la sustitución no homóloga, es decir, de una clase de residuos por otra, o implicando como alternativa la inclusión de aminoácidos no naturales como ornitina (de aquí en adelante denominada

Z), ornitina de ácido diaminobutírico (de aquí en adelante denominada B), ornitina norleucina (de aquí en adelante denominada O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazamientos pueden realizarse también con aminoácidos no naturales incluyendo: aminoácidos alfa* y alfa disustituidos*, N-alquilaminoácidos*, ácido láctico*, derivados haluro de aminoácidos naturales como trifluorotirosina*, p-Cl-fenilalanina*, p-Br-fenilalanina*, p-I-fenilalanina*, L-alilglicina*, β-alanina*, ácido L-α-aminobutírico*, ácido L-γ-aminobutírico*, ácido L-α-aminoisobutírico*, ácido L-ε-aminocaproico', ácido 7-aminoheptanoico*, L-metioninasulfona'*, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxiprolina', L-tioprolina*, derivados metilo de fenilalanina (Phe) como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L-Phe (4-amino)', L-Tyr (metilo)*, L-Phe (4-isopropilo)*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico)*, ácido L-diaminopropiónico' y L-Phe (4-bencilo)*. La notación * se ha utilizado con los fines de la discusión anterior (relativa a la sustitución homóloga o no homóloga), para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado, mientras que ' se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado, '* indica características anfipáticas.

2210

Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden estar insertados entre dos residuos de aminoácidos cualesquiera de la secuencia, incluyendo grupos alquilo como grupos metilo, etilo o propilo además de espaciadores de aminoácidos como residuos de glicina o $\beta$-alanina. Otra forma de variación, que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoide, será bien comprendida por los expertos en la técnica. Para evitar dudas "la forma peptoide" se utiliza para referirse a residuos de aminoácidos variantes en los que el grupo sustituyente del carbono $\alpha$ está sobre el átomo de nitrógeno del residuo más que sobre al carbono $\alpha$. Los procedimientos para preparar péptidos en forma peptoide son conocidos en la técnica, por ejemplo Simon, R.J., et al., PNAS (1992) 89(29), 9367-9371 y Hornwell D.C., Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

## HIBRIDACION

La presente invención comprende también el uso de secuencias que pueden hibridarse con las secuencias diana presentadas en la presente, como si el agente fuese una secuencia sin sentido.

El término "hibridación", como se utiliza en la presente,

2211

incluye "el procedimiento mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria mediante apareamiento de bases", así como el procedimiento de amplificación como el que se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena con polimerasa (PCR).

Las secuencias de nucleótidos de la invención capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente, o con su complemento, serán al menos un 75%, preferiblemente al menos un 85 ó 90% y más preferiblemente al menos un 95% ó 98% homólogas a las secuencias de nucleótidos complementarias correspondientes presentadas en la presente, en una región de al menos 20, preferiblemente al menos 25 ó 30, por ejemplo al menos 40, 60 ó 100 o más nucleótidos contiguos. Las secuencias de nucleótidos preferidas de la invención comprenderán regiones homólogas a la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC Nº ID 2 del listado de secuencias de la presente invención, preferiblemente al menos un 80 ó 90%, y más preferiblemente al menos un 95% homólogas a la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC Nº ID 2 del listado secuencias de la presente invención.

El término "selectivamente hibridable" significa que la secuencia de nucleótidos, cuando se utiliza como sonda, se utiliza en condiciones en las que se encuentra que la secuencia de nucleótidos diana se hibrida con la sonda a un nivel significativamente por encima del fondo. La hibridación de fondo puede aparecer debido a otras secuencias de nucleótidos presentes, por ejemplo en la biblioteca de cDNA o de DNA genómico que se rastrea. En este caso, el fondo implica un nivel de señal generada por la interacción entre la sonda y un miembro de la biblioteca de DNA no específico que tiene menos de 10 veces, preferiblemente menos de 100 veces, la intensidad de la interacción específica observada en el DNA diana. La intensidad de la interacción puede medirse, por ejemplo, por marcado radiactivo de la sonda, por ejemplo con $^{32}P$.

Las condiciones de hibridación están basadas en la temperatura de fusión (Tm) del complejo de unión del ácido nucleico, como explican Berger y Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methodos in Enzimology, Vol 152, Academic Press, San Diego, CA), y confieren un "rigor" definido como se explica a continuación.

El rigor máximo aparece típicamente a aproximadamente Tm-5°C (5°C por debajo de la Tm de la sonda), el rigor elevado a aproximadamente 5°C a 10°C por debajo de la Tm, el rigor intermedio a aproximadamente 10°C a 20°C por debajo de la

Tm, y el rigor bajo a aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de la Tm. Como comprenderán los expertos en la técnica, una hibridación de rigor máximo puede utilizarse para identificar o detectar secuencias de nucleótidos idénticas mientras que una hibridación de rigor intermedio (o bajo) puede utilizarse para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos similares o relacionadas.

En un aspecto preferido, la presente invención cubre secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con la secuencia de nucleótidos de la presente invención en condiciones rigurosas (por ejemplo a 65°C y 0,1xSSC (1xSSC = NaCl 0,15 M, $Na_3$citrato 0,015 M, pH = 7,0). Cuando la secuencia de nucleótidos de la invención es de doble cadena, ambas cadenas del dúplex, individualmente o en combinación, están comprendidas por la presente invención. Cuando la secuencia de nucleótidos es de una cadena, se comprende que la secuencia complementaria de esa secuencia de nucleótdos está también incluida en el alcance de la presente invención.

Las secuencias de nucleótidos que no son un 100% homólogas a las secuencias de la presente invención pero que entran dentro del alcance de la invención, pueden obtenerse mediante una serie de formas. Otras variantes de las

2214

~~2215~~

secuencias descritas en la presente pueden obtenerse por ejemplo por sondeo de bibliotecas de DNA preparadas a partir de una serie de fuentes. Además, pueden obtenerse otros homólogos víricos/bacterianos o celulares, particularmente homólogos celulares encontrados en células de mamíferos, (por ejemplo células de rata, ratón, bovinas y de primate) y dichos homólogos y fragmentos de éstos serán en general capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente. Dichas secuencias pueden obtenerse sondeando bibliotecas de cDNA preparadas a partir de, o bibliotecas de DNA genómico a partir de otras especies animales y sondeando dichas bibliotecas con sondas que comprenden toda o parte de la secuencia de nucleótidos descrita en la presente en condiciones de medio a alto rigor. Se aplican consideraciones similares para obtener especies homólogas y variantes alélicas de las secuencias de aminoácidos y/o de nucleótidos de la presente invención.

Las variantes y homólogos de cepas/especies pueden obtenerse también utilizando PCR degenerada que utilizará cebadores diseñados para dirigirse a secuencias en las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, por alineamiento de las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencias pueden realizarse utilizando software informático conocido en la técnica. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp es ampliamente utilizado. Los cebadores utilizados en PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones de menor rigor que las utilizadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia simple frente a secuencias conocidas.

Como alternativa, dichas secuencias de nucleótidos pueden obtenerse por mutagénesis dirigida específica de sitio de secuencias caracterizadas, como la secuencia de nucleótidos descrita en SEC Nº ID 2 del listado de secuencias de la presente invención. Esto puede ser útil cuando se requieren por ejemplo cambios silenciosos de codón en las secuencias para optimizar las preferencias de codón para una célula huésped particular en la que se expresan las secuencias de nucleótidos. Pueden desearse otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o para alterar la actividad de la proteína codificada por las secuencias de nucleótidos.

Las secuencias de nucleótidos de la presente invención

2216

pueden utilizarse para producir un cebador, por ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo marcada con un marcador revelable por medios convencionales utilizando marcaje radiactivo o no radiactivo, o las secuencias de nucleótidos pueden clonarse en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos serán al menos de 15, preferiblemente al menos de 20, por ejemplo al menos de 25, 30 ó 40 nucleótidos de longitud, y están también comprendidos en el término secuencia de nucleótidos de la invención como se utiliza en la presente.

Las secuencias de nucleótidos como polinucleótidos de DNA y sondas según la invención, pueden producirse recombinantemente, sintéticamente, o mediante cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También pueden clonarse por técnicas estándar.

En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, implicando una fabricación por etapas de la secuencia de nucleótidos deseada, un nucleótido cada vez. Las técnicas para conseguir ésto utilizando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

Las secuencias de nucleótidos más largas generalmente se

2217

producirán utilizando medios recombinantes, por ejemplo utilizando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará preparar un par de cebadores (por ejemplo de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) adyacentes a la región de la secuencia diana que se desea clonar, poner los cebadores en contacto con mRNA o cDNA obtenido a partir de una célula animal o humana, realizar una reacción en cadena con polimerasa (PCR) en condiciones que llevan a la amplificación de la región deseada, aislan el fragmento amplificado (por ejemplo por purificación de la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperar el DNA amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de modo que el DNA amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

Debido a la degeneración inherente al código genético, pueden utilizarse otras secuencias de DNA que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos, o una funcionalmente equivalente para clonar y expresar las secuencias diana. Como comprenderán los expertos en la técnica, para ciertos sistemas de expresión, puede ser ventajoso producir las secuencias diana con codones de origen no natural. Los codones preferidos para un huésped procariota o eucariota particular (Murray et al, (1989) Nuc

Acids Res 17:477-508) pueden seleccionarse, por ejemplo, para aumentar la tasa de expresión de la diana o para producir transcriptos de RNA recombinante con propiedades deseables, como una semivida más larga que los transcriptos producidos a partir de secuencias de origen natural.

## VECTORES DE EXPRESION

La secuencia de nucleótidos para uso como diana o para expresar la diana puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede utilizarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos en y/o a partir de una célula huésped compatible. La expresión puede controlarse utilizando secuencias de control que incluyen promotores/estimuladores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden utilizarse promotores procarióticos y promotores funcionales en células eucarióticas. Pueden utilizarse promotores específicos de tejido o específicos de estímulo. También pueden utilizarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes descritos anteriormente.

La proteína producida por una célula huésped recombinante mediante expresión de la secuencia de nucleótidos, puede segregarse o puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector utilizados. Las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de la sustancia codificada por las secuencias a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular.

## PROTEINAS DE FUSION

La secuencia de aminoácidos diana puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo como ayuda en la extracción y purificación. Ejemplos de compañeros de proteína de fusión incluyen glutation-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a DNA y/o activación transcripcional) y $\beta$-galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de corte proteolítico entre la secuencia del compañero de la proteína de fusión y la secuencia de proteína de interés para permitir la eliminación de las secuencias de la proteína de fusión. Preferiblemente la proteína de fusión no impedirá la actividad de la diana.

La proteína de fusión puede comprender un antígeno o un determinante antigénico condensado a la sustancia de la presente invención. En esta realización, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión de origen no natural que comprende una sustancia que puede actuar como

220

coadyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmune. El antígeno o el determinante antigénico puede estar unido al extremo amino o carboxi de la sustancia.

En otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos puede estar ligada a una secuencia heteróloga que codifica una proteína de fusión. Por ejemplo, para rastrear bibliotecas de péptidos en busca de agentes capaces de influir en la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia quimérica que exprese un epitopo heterólogo que es reconocido por un anticuerpo disponible comercialmente.

## ANTICUERPOS

En una realización de la presente invención, el agente de la presente invención puede ser un anticuerpo. Además, o como alternativa, la diana de la presente invención puede ser un anticuerpo. Además, o como alternativa, el medio para detectar la diana de la presente invención puede ser un anticuerpo.

Los anticuerpos pueden producirse por técnicas estándar, tal como por inmunización con la sustancia de la invención o utilizando una biblioteca de muestra de fagos.

Para los fines de esta invención, el término "anticuerpo", a menos que se especifique otra cosa, incluye, aunque no está limitado a ellos, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena simple, fragmentos Fab, fragmentos producidos por biblioteca de expresión Fab, así como miméticos de éstos. Dichos fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos enteros que conserven su actividad de unión para una sustancia diana, los fragmentos Fv, F(ab') y $F(ab')_2$, así como los anticuerpos de cadena simple (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Además, los anticuerpos y fragmentos de éstos pueden ser anticuerpos humanizados. Los anticuerpos neutralizantes, es decir, aquellos que inhiben la actividad biológica de los polipéptidos de la sustancia, son especialmente preferidos para diagnóstico y terapia.

Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero seleccionado (por ejemplo ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con un polipéptido inmunogénico que lleva un(os) epitopo(s) obtenible a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención. Dependiendo de la especie huésped, pueden utilizarse diversos coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Dichos coadyuvantes incluyen, aunque no están limitados a ellos, geles minerales de Freund como hidróxido de aluminio y sustancias activas en superficie como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa de bocallave y dinitrofenol. el BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) y el *Corynebacterium parvum* son coadyuvantes humanos potencialmente útiles que pueden emplearse si el polipéptido de la sustancia purificado se administra a individuos inmunológicamente comprometidos con el fin de estimular la defensa sistémica.

El suero del animal inmunizado se recoge y se trata según procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales hacia un epitopo obtenible a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención contiene anticuerpos hacia otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para producir y procesar los antisueros policlonales son conocidas en la técnica. Para poder preparar dichos anticuerpos, la invención proporciona también polipéptidos de la invención o fragmentos de éstos haptenizados por otro polipéptido para uso como inmunógenos en animales o humanos.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia epitopos obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada pueden producirse fácilmente por un experto en la técnica. La metodología general para preparar anticuerpos monoclonales mediante hibridomas es bien conocida. Pueden crearse líneas celulares de producción de anticuerpos inmortales por fusión celular, y también por otras técnicas como transformación directa de linfocitos B con DNA oncogénico, o transfección con virus Epstein-Barr. Pueden rastrearse los paneles de anticuerpos monoclonales producidos frente a epitopos de órbita para determinar diversas propiedades, es decir, la afinidad de isotipo y epitopo.

Los anticuerpos monoclonales de la sustancia y/o agente identificado pueden prepararse utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, aunque no están limitadas a ellas, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Koehler y Millstein (1975 Nature 256:495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., (1983) Immunol. Today 4:72, Cote et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80:2026-

2030) y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss Inc., pág. 77-96). Además, pueden utilizarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", así como para la separación de genes de anticuerpo de ratón de genes de anticuerpo humanos para obtener una molécula con especificidad de antígeno y actividad biológica apropiadas (Morrison et al. (1984) Prc. Natl, Acad. Sci. 81:6851-6855, Neuberger et al. (1984) Nature 312:604-608, Takeda et al (1985) Nature 314:452-454). Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de Estados Unidos nº 4.946.779) pueden adaptarse para producir los anticuerpos de cadena sencilla específicos de la sustancia.

Los anticuerpos, tanto monoclonales como policlonales, que están dirigidos hacia epitopos obtenibles a partir de un agente y/o sustancia identificada de la presente invención son particularmente útiles en diagnóstico, y aquellos que son neutralizantes son útiles en inmunoterapia pasiva. Los anticuerpos monoclonales, en particular, pueden utilizarse para excitar anticuerpos anti-idiotipo. Los anticuerpos anti-idiotipo son inmunoglobulinas que llevan una "imagen interna" de la sustancia y/o agente frente al que se desea protección.

Las técnicas para excitar anticuerpos anti-idiotipo son conocidas en la técnica. Estos anticuerpos anti-idiotipo pueden ser útiles también en terapia.

Los anticuerpos pueden producirse también por inducción de la producción in vivo de la población de linfocitos o por rastreo de bibliotecas de inmunoglobulinas recombinantes o paneles de reactivos de unión altamente específicos como se describen en Orlandi et al. (1989, Proc. Natl. Acad. Sci. 86:3822-3837) y Winter, G., y Milstein, C. (1991, Nature, 349:293-299).

También pueden generarse fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específica para la sustancia. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, aunque no están limitados a ellos, los fragmentos $F(ab')_2$ que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab que pueden generarse por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Como alternativa, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab para permitir una rápida y sencilla identificación de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse W.D., et al., (1989) Science

2226

256:1275-128 1).

## SEÑALIZADORES

Puede utilizarse una amplia variedad de señalizadores en los procedimientos de ensayo (así como en los rastreos) de la presente invención, proporcionando los señalizadores preferidos señales convenientemente detectables (por ejemplo por espectroscopía). Como ejemplo, un gen señalizador puede codificar una enzima que cataliza una reacción que altera las propiedades de absorción de luz.

Ejemplos de moléculas señalizadoras incluyen, aunque no están limitadas a ellas, β-galactosidasa, invertasa, proteína de fluorescencia verde, luciferasa, cloranfenicol, acetiltransferasa, β-glucuronidasa, exo-glucanasa y glucoamilasa. Como alternativa, pueden incorporarse nucleótidos marcados radiactivamente o marcados fluorescentemente a transcriptos nacientes que se identifican después cuando se unen a las sondas de oligonucleótidos.

En una realización preferida, la producción de la molécula de señalizador se mide por la actividad enzimática del producto del gen señalizador, como la β-galactosidasa.

2227

Se conocen en la técnica una serie de protocolos para detectar y medir la expresión de la diana, tal como utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales específicos de la proteína. Los ejemplos incluyen enzimoinmunoensayo (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas fluorescentes (FACS). Se prefiere un inmunoensayo basado en anticuerpos monoclonales de dos sitios, que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos con dos epitopos no interferentes en polipéptidos, pero puede emplearse un ensayo de unión competitiva. Estos y otros ensayos se describen, entre otros lugares, en Hampton R., et al. (1990), Serological Methods, A Laboratory Manual, APS Press, St. Paul MN) y Maddox D.E. e al., (1983 , J. Exp. Med. 15 8:121 1).

Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de técnicas de marcaje y conjugación que pueden utilizarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Los medios para producir hibridación marcada o sondas PCR para detectar las secuencias del polinucleótido diana incluyen el marcaje de oligonucleótidos, traducción por muescas; marcaje terminal o amplificación por PCR utilizando un oligonucleótido marcado. Como alternativa, la secuencia de codificación, o cualquier porción de ella, puede clonarse en un vector para la producción de una sonda de mRNA.

2208

Dichos vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles y pueden utilizarse para sintetizar sondas de RNA in vitro por adición de una polimerasa de RNA apropiada como T7, T3 o SP6 y nucleótidos marcados.

Una serie de compañías como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp. (Cleveland, OH) suministran estuches comerciales y protocolos para estos procedimientos. Las moléculas señalizadoras o marcadores adecuadas incluyen radionucleidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que explican el uso de dichos marcadores incluyen los documentos US-A-3817837, US-A-3850752, US-A-3939350, US-A-3996345, US-A-4277437, US-A-4275149 y US-A-4366241. Además, las inmunoglobulinas recombinantes pueden producirse como se muestra en el documento US-A-4816567.

Los procedimientos adicionales para cuantificar la expresión de una molécula particular incluyen el marcaje radiactivo (Melby, P.C., et al. 1993, J. Immunol. Methods 159:235-44) o la biotinilación (Duplaa, C.et al., 1993, Anal. Biochem. 229-36) de nucleótidos, la coamplificación de un ácido nucleico control y curvas estándar en las que se interpolan los resultados experimentales. La cuantificación de muestras múltiples puede acelerarse realizando el ensayo en formato ELISA, en el que el oligómero de interés se presenta a varias diluciones y la respuesta espectrofotométrica o calorimétrica proporciona una rápida cuantificación.

Aunque la presencia/ausencia de expresión de un gen marcador sugiere que el gen de interés está también presente, su presencia y su expresión deben confirmarse. Por ejemplo, si la secuencia de nucléotidos se inserta en una secuencia de un gen marcador, las células recombinantes que contienen el mismo pueden identificarse por la ausencia de la función del gen marcador. Como alternativa, un gen marcador puede colocarse en tándem con una secuencia de codificación diana bajo el control de un promotor simple. La expresión del gen marcador en respuesta a la inducción o selección indica habitualmente la expresión de la diana también.

Como alternativa, las células huésped que contienen la secuencia de codificación para la diana y que expresan las regiones de codificación de la diana pueden identificarse mediante una serie de procedimientos conocidos por los

230

expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, aunque no están limitados a ellos, la hibridación DNA-DNA o DNA-RNA y la técnica de bioensayo o inmunoensayo de proteínas, que incluyen tecnologías basadas en membrana, basadas en disoluciones o basadas en chips para la detección y/o cuantificación del ácido nucleico o de la proteína.

## ENSAYOS GENERALES DE LA ACTIVIDAD/NIVELES DE cAMP

Puede determinarse la capacidad de un agente de ensayo para potenciar el cAMP midiendo un aumento o reducción relevante de un nivel diana. Además, o como alternativa, puede determinarse la capacidad de un agente de ensayo para potenciar el cAMP midiendo un aumento relevante de los niveles de cAMP. Como ejemplo, pueden adaptarse las explicaciones de Smith et al., 1993 (Appl. Biochem. Biotechol., 41:189-218). Existen también estuches de inmunoensayo disponibles comercialmente para la medida del cAMP (por ejemplo Amersham International, Arlington Heights, IL y DuPont, Boston, MA). Se proporcionan los detalles de un ensayo de cAMP adecuado en la sección experimental.

## RASTREOS

2231

Puede utilizarse cualquiera de uno o más dianas adecuadas, como una seuencia de aminoácidos y/o una secuencia de nucleótidos, para identificar un $P_{cAMP}$ en cualquiera de una serie de técnicas de rastreo de medicamentos. La diana empleada en dicho ensayo puede estar libre en disolución, fijada a un soporte sólido, portada sobre una superficie celular o localizada intracelularmente. La diana puede estar incluso en un modelo animal, pudiendo ser dicha diana una diana exógena o una diana introducida. El modelo animal será un modelo animal no humano. Puede medirse la anulación de la actividad de la diana o la formación de complejos de unión entre la diana y el agente a ensayar.

Las técnicas de rastreo de medicamentos pueden basarse en el procedimiento descrito en Geysen, solicitud de patente europea 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. En resumen, se sintetiza un gran número de diferentes compuestos de ensayo peptídicos pequeños sobre un sustrato sólido, como puntas de plástico o alguna otra superficie. Se hacen reaccionar los compuestos peptídicos de ensayo con una diana adecuada o fragmento de ésta y se lavan. Se detectan entonces las entidades unidas, por ejemplo por procedimientos de adaptación adecuados bien conocidos en la técnica. También pueden recubrirse directamente con una diana purificada placas para uso en técnicas de rastreo de

232

medicamentos. Como alternativa, pueden utilizarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

Esta invención contempla también el uso de ensayos de rastreo de medicamentos competitivos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a una diana compiten específicamente con un compuesto de ensayo para la unión a la diana.

Otra técnica de rastreo proporciona un rastreo de alto rendimiento (HTS) de agentes con afinidad de unión adecuada hacia las sustancias y está basado en el procedimiento descrito en el documento WO 84/03564.

Se espera que los procedimientos de ensayo de la presente invención sean adecuados para el rastreo tanto a pequeña como a gran escala de los compuestos de ensayo, así como en ensayos cuantitativos.

De esta manera, la presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian el cAMP, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de cAMP.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian selectivamente el cAMP en genitales sexuales femeninos, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada de los genitales sexuales femeninos con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de cAMP.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian el cAMP, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de la diana.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar agentes que potencian selectivamente el cAMP en genitales sexuales femeninos, comprendiendo el procedimiento poner en contacto una diana adecuada de los genitales sexuales femeninos con el agente y medir entonces la actividad y/o niveles de la diana.

En un aspecto preferido, el rastreo de la presente invención comprende al menos las siguientes etapas (que no tienen porqué estar en este mismo orden consecutivo): (a) realizar un rastreo in vitro para determinar si un agente candidato tiene la actividad relevante (tal como modulación de PDEII), (b) realizar uno o más rastreos selectivos para determinar la selectividad del citado agente candidato (por ejemplo para ver si el citado agente es también un inhibidor de ACE, utilizando, por ejemplo, el protocolo de ensayo presentado en la presente) y (c) realizar un rastreo in vivo con el citado agente candidato (por ejemplo utilizando un modelo animal funcional). Típicamente, si el citado agente candidato pasa el rastreo (a) y el rastreo (b), se realiza el rastreo (c).

## DIAGNOSTICOS

La presente invención proporciona también una composición o estuche de diagnóstico para la detección de una predisposición al FSAD. A este respecto, la composición o estuche comprenderá una entidad que es capaz de indicar la presencia de uno o más, o incluso la ausencia de uno o más, de las dianas en una muestra de ensayo. Preferiblemente, la muestra de ensayo se obtiene a partir de genitales sexuales femeninos o de una secreción de éstos.

Como ejemplo, la composición de diagnóstico puede comprender cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas en la presente o una variante, homólogo, fragmento o derivado de éstos, o una secuencia capaz de

1235

hibridarse con toda o con una parte de cualquiera de las secuencias de nucleótidos.

Para proporcionar una base para el diagnóstico de la enfermedad, deben establecerse valores patrón o valores normales de una diana. Esto pueden conseguirse combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con un anticuerpo hacia una diana, en condiciones adecuadas para la formación de complejos, que son bien conocidas en la técnica. La cantidad de formación de complejo patrón puede cuantificarse por comparación con una serie de diluciones de controles positivos en los que se combina una cantidad conocida de anticuerpo con concentraciones conocidas de una diana purificada. Después, los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por FSAD. La desviación entre los valores patrón y los del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad.

Una diana misma, o cualquier parte de ella, puede proporcionar la base para un compuesto de diagnóstico y/o terapéutico. Con fines de diagnóstico, las secuencias de polinucleótidos diana pueden utilizarse para detectar y cuantificar la expresión genética en dolencias, trastornos o enfermedades en las que pueda estar implicada el FSAD.

La secuencia de polinucleótidos que codifica la diana puede utilizarse para el diagnóstico del FSAD resultante de la expresión de la diana. Por ejemplo, las secuencias de polinuclétidos que codifican una diana pueden utilizarse en ensayos de hibridación o de PCR de tejidos procedentes de biopsias o autopsias o fluidos biológicos, para detectar anormalidades en la expresión de la diana. La forma de dichos procedimientos cuantitativos o cualitativos puede incluir análisis Southern o Northern, transferencia por puntos u otras tecnologías basadas en membrana, tecnologías PCR, varillas de sondeo, tecnologías de puntas o chips, y ELISA u otras tecnologías de formato de múltiples muestras. Todas estas técnicas son bien conocidas en la técnica y son de hecho la base de muchos estuches de diagnóstico comercialmente disponibles.

Dichos ensayos pueden ajustarse para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico particular y pueden utilizarse en estudios animales, en ensayos clínicos o para monitorizar el tratamiento de un paciente individual. Para proporcionar una base para el diagnóstico de una enfermedad debe establecerse un perfil normal o patrón para la expresión de la diana. Esto se consigue combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, animales o humanos, con la diana o una porción de ésta, en condiciones adecuadas para la hibridación o amplificación. La hibridación patrón puede cuantificarse por comparación de los valores obtenidos de sujetos normales con una serie de diluciones de controles positivos ensayados en el mismo experimento, en que se utiliza una cantidad conocida de diana purificada. Los valores patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de muestras de sujetos potencialmente afectados por un trastorno o enfermedad relacionado con la expresión de la secuencia de codificación de la diana. La desviación entre los valores patrón y los del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad. Si se establece la enfermedad, se administra un agente terapéutico existente y pueden generarse valores o perfiles de tratamiento. Finalmente, puede repetirse el ensayo regularmente para evaluar si los valores se alejan o se acercan al esquema normal o patrón. Los perfiles de tratamiento sucesivos pueden utilizarse para mostrar la eficacia del tratamiento durante un periodo de varios días o varios meses.

De esta manera, en un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido diana o variante, homólogo, fragmento o derivado de éste, para producir anticuerpos anti-diana que pueden, por ejemplo, utilizarse como diagnóstico para detectar y cuantificar los niveles de diana en estados de FSAD.

La presente invención proporciona también ensayos y estuches de diagnóstico para la detección de una diana en células y tejidos, que comprenden una diana purificada que puede utilizarse como control positivo, y anticuerpos anti-diana. Dichos anticuerpos pueden utilizarse en tecnologías basadas en disoluciones, basadas en membrana o basadas en tejidos para detectar cualquier estado de enfermedad o dolencia relacionado con la expresión de la proteína diana o con la expresión de las deleciones o de una variante, homólogo, fragmento o derivado de éste.

## PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO

Las composiciones y/o procedimientos y/o estuches de diagnóstico pueden utilizarse en las siguientes técnicas que incluyen, aunque no están limitadas a ellos, ensayos competitivos y no competitivos, radioinmunoensayo, ensayos de bioluminiscencia y quimioluminiscencia, ensayos fluorométricos, ensayos de "en sandwich", ensayos inmunorradiométricos, transferencia por puntos, ensayos ligados a enzimas, incluyendo ELISA, placas de microensayo, bandas recubiertas de anticuerpos o varillas de sonda para una rápida monitorización de la orina o sangre, inmunoquímica e inmunocitoquímica.

Como ejempo, un estuche inmunohistoquímico puede utilizarse también para la localización de actividad NPY en tejido genital. Este estuche de inmunohistoquímica permite la localización de NPY en secciones de tejido y en células cultivadas utilizando tanto microscopía óptica como electrónica, que puede utilizarse con fines tanto de investigación como clínicos. Dicha información puede ser útil para diagnóstico y posiblemente para fines terapéuticos en la detección y/o prevención y/o tratamiento de la FSD, como FSAD. Para cada estuche se establecen un intervalo, sensibilidad, precisión, fiabilidad, especificidad y reproducibilidad del ensayo. La variación intraensayo e interensayo se establece en los puntos al 20%, 50% y 80% de las curvas estándar de desplazamiento o actividad.

## SONDAS

Otro aspecto de la invención en cuestión es la provisión de sondas de hibridación de ácidos nucleicos o de PCR que

2240

son capaces de detectar (especialmente aquellas que son capaces de seleccionar selectivamente) secuencias de polinucleótidos, incluyendo secuencias genómicas, que codifican una región de codificación de la diana o moléculas estrechamente relacionadas, como alelos. La especificidad de la sonda, es decir, si deriva de una región o dominio altamente conservado, conservado o no conservado, y el rigor de la hibridación o amplificación (alto, intermedio, bajo) determinarán si la sonda identifica sólo las secuencias de codificación de la diana de origen natural, o secuencias relacionadas. Las sondas de detección de secuencias de ácidos nucleicos relacionados se seleccionan de regiones de nucléotidos conservadas o altamente conservadas de los miembros de la familia de la diana y dichas sondas pueden utilizarse en un conjunto de sondas degeneradas. Para la detección de secuencias de ácidos nucleicos idénticas, o cuando se desea una máxima especificidad, las sondas de ácidos nucleicos se seleccionan de regiones de nucleótidos no conservadas o regiones únicas de los polinucleótidos diana. Como se utiliza en la presente, el término "región de nucleótidos no conservada" se refiere a un región de nucleótisos que es única en una secuencia de codificación de la diana descrita en la presente y que no aparece en miembros de la familia relacionados.

2241

La PCR, como se describre en los documentos US-A-4683195, US-A-4800195 y US-A-4965188, proporciona usos adicionales para los oligonucleótidos basados en secuencias diana. Dichos oligonucleótidos generalmente se sintetizan químicamente, pero pueden generarse enzimáticamente o producirse a partir de una fuente recombinante. Los oligómeros comprenden generalmente dos secuencias de nucleótidos, una de orientación con sentido (5'->3') y otra de orientación sin sentido (3'->5') empleadas en condiciones optimizadas para la identificación de un gen o estado específico. Estos dos mismos oligómeros, conjuntos encargados de oligómeros, o incluso un conjunto degenerado de oligómeros, pueden emplearse en condiciones menos rigurosas para la detección y/o cuantificación de secuencias de DNA o RNA estrechamente relacionadas.

La secuencia de ácidos nucleicos para una diana puede utilizarse también para generar sondas de hibridación, como se ha descrito anteriormente, para mapear la secuencia genómica endógena. La secuencia puede mapearse en un cromosoma particular o en una región específica del cromosoma utilizando técnicas bien conocidas. Estas incluyen hibridación in situ para dispersiones cromosómicas (Verma et al. (1988) Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York City), preparaciones

2242

cromosómicas con clasificación de flujo o construcciones de cromosomas artificiales como YAC, cromosomas bacterianos artificiales (BAC), construcciones bacterianas PI o bibliotecas de cDNA de cromosomas simples.

La hibridación in situ de preparaciones cromosómicas y las técnicas de mapeo físico, como el análisis de ligamiento utilizando marcadores cromosómicos establecidos, son inestimables en la extensión de los mapas genéticos. Pueden encontrarse ejemplos de mapas genéticos en Science (1995, 270:410 y siguientes y 1994, 265:1981 y siguientes). A menudo, la posición de un gen en un cromosoma de otra especie de mamífero puede revelar marcadores asociados incluso si el número o el brazo de un cromosoma humano particular no es conocido. Pueden asignarse nuevas secuencias a los brazos cromosómicos, o a partes de éstos, por mapeo físico. Esto proporciona información valiosa a los investigadores que buscan los genes de las enfermedades utilizando clonación posicional u otras técnicas de descubrimiento de genes. Una vez se ha localizado aproximadamente una enfermedad o síndrome por ligamiento genético a una región genómica particular, cualquier mapeo de secuencias de ese área puede representar genes asociados o reguladores para investigaciones posteriores. La secuencia de nucleótidos objeto de la invención puede utilizarse también para detectar diferencias en la localización cromosómica debida a translocación, inversión, etc., entre individuos normales, portadores o afectados.

## CELULAS HUESPED

El término "célula huésped" en relación con la presente invención incluye cualquier célula que podría comprender la diana del agente.

De esta manera, otra realización de la presente invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas con un polinucleótido que es o que expresa la diana. Preferiblemente, el citado polinucleótido se lleva en un vector de replicación y expresión de los polinucleótidos que son la diana o que expresan la diana. Las células se elegirán para que sean compatibles con el citado vector y pueden ser por ejemplo células procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levadura o de plantas.

La bacteria gram-negativa *E. coli* se utiliza ampliamente como huésped para la expresión de genes heterólogos. Sin embargo, tienden a acumularse grandes cantidades de proteína heteróloga dentro de la célula. La purificación posterior de la proteína deseada de las proteínas intracelulares de *E. coli* en bruto puede ser difícil a veces.

En contraposición con *E. coli*, las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como huéspedes heterólogos por su capacidad de segregar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como huéspedes son las de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención, y/o del deseo de un procesamiento posterior de la proteína expresada, pueden preferirse huéspedes eucarióticos como levaduras u otros hongos. En general, se prefieren las células de levadura frente a las células fúngicas porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas las segregan mal las células de levadura, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo hiperglicosilación en levadura). En estos casos, debe seleccionarse un organismo huésped fúngico diferente.

Ejemplos de huéspedes de expresión adecuados dentro del alcance de la presente invención son hongos como la especie *Aspergillus* (como las descritas en el documento EP-A-0184438 y EP-A-0284603) y especie *Trichoderma*, bacterias como la especie *Bacillus* (como las descritas en los documentos EP-A-0134048 y EP-A-0253455), la especie *Streptomyces* y especie *Pseudomonas* y levaduras como la especie *Kluyveromyces* (como las descritas en los documentos EP-A-0096430 y EP-A-0301670) y la especie *Saccharomyces*. Como ejemplo, los huéspedes de expresión típicos pueden seleccionarse de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger var. tubigensis*, *Aspergillus niger var. awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus orvzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis y Saccharomyces cerevisiae*.

El uso de células huésped adecuadas, como células huésped de levaduras, hongos y plantas, puede proporcionar modificaciones post-transcripcionales (por ejemplo miristoilación, glicosilación, truncado, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) como puede ser necesario para conferir una actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinante de la presente invención.

ORGANISMO

El término "organismo" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que podría comprender la diana y/o productos obtenidos de ésta. Los ejemplos de organismos pueden incluir un hongo, levadura o planta.

El término "organismo transgénico" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprende la diana y/o los productos obtenidos.

TRANSFORMACION DE CELULAS HUESPED/ORGANISMOS HUESPED

Como se indicó anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las explicaciones sobre la transformación de huéspedes procarióticos está bien documentada en la técnica, por ejemplo véase Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2° edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, Inc.

Si se utiliza un huésped procariótico, puede ser necesario modificar la secuencia de nucleótidos adecuadamente antes de la transformación, tal como por eliminación de intrones.

En otra realización, el organismo transgénico puede ser una levadura. A este respecto, las levaduras también se han utilizado ampliamente como vehículo para la expresión de genes heterólogos. La especie *Saccharomyces cerevisiae* tiene una larga historia de uso industrial, incluyendo su uso para la expresión de genes heterólogos. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido revisada por Goodey et al (1987, Yeast Biotechnology, D.R. Berry et al., eds., pág. 401-429, Allen y Unwin, Londres) y por King, et al. (1989, Molecular and Cell Biology of Yeasts, E.F. Walton y G.T. Yarronton, eds., pág. 107-133, Blackie, Glasgow).

Por varias razones, *Saccharomyces cerevisiae* es adecuada para la expresión de genes heterólogos. En primer lugar, no es patogénica para humanos y es incapaz de producir ciertas endotoxinas. En segundo lugar, tiene una larga historia de uso seguro durante siglos de explotación comercial con varios fines. Esto ha llevado a una amplia aceptación del público. En tercer lugar, el uso comercial e investigación dedicadas al organismo ha dado como resultado una riqueza de conocimientos sobre su genética y fisiología así como sobre las características de fermentación a gran escala de *Saccharomyces cerevisiae*.

2248

Se proporciona una revisión de los principios de la expresión de genes heterólogos en Sacccharomyces cerevisiae y de la secreción de productos genéticos en H. Hinchcliffe, E. Kenny (1993, "Yeast as a vehicule for the expression of heterologous genes", Yeasts, vol 5, Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, eds., 2ª edición, Academic Press Ltd.).

Están disponibles varios tipos de vectores de levaduras, incluyendo vectores integradores, que necesitan la recombinación con el genoma del huésped para su mantenimiento y la replicación autónoma en vectores plásmidos.

Para preparar Saccharomyces transgénica, se preparan las construcciones de expresión por inserción de la secuencia de nucleótidos de la presente invención en una construcción diseñada para la expresión en levadura. Se han desarrollado varios tipos de construcciones utilizadas para la expresión heteróloga. Las construcciones contienen un promotor activo de levadura fusionado con la secuencia de nucleótidos de la presente invención, habitualmente se utiliza un promotor proveniente de levadura, como el promotor GAL1. Habitualmente se utiliza una secuencia señal proveniente de levadura, como la secuencia que codifica el péptido señal SUC2. Un terminador activo de levadura termina el sistema de expresión.

Para la transformación de levaduras se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, puede prepararse una Saccharomyces transgénica según la presente invención siguiendo las expliaciones de Hinnen et al. (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929), Beggs, J.D. (1978, Nature, Londres, 275, 104) e Ito, H. et al. (1983, J. Bacteriology 153, 163-168).

Las células de levadura transformadas se seleccionan utilizando diversos marcadores selectivos. Entre los marcadores utilizados para la transformación existe una serie de marcadores auxotróficos como LEU2, HIS4 y TRP1, y marcadores de resistencia a antibióticos dominantes como marcadores del antibiótico aminoglicósido, por ejemplo G418.

Otro organismo huésped es una planta. El principio básico en la construcción de plantas genéticamente modificadas es insertar información genética en el genoma de la planta de modo que se obtenga un mantenimiento estable del material genético insertado. Existen algunas técnicas para la inserción de información genética, siendo las dos principales la introducción directa de la información

2250

genética y la introducción de la información genetica mediante el uso de un sistema de vector. Puede encontrarse una revisión de las técnicas generales en artículos de Potrykus (Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech Marzo/abril 1994 17-27). Pueden encontrarse otras explicaciones sobre transformación de plantas en el documento EP-A-0449375.

De esta manera, la presente invención proporciona también un procedimiento de transformación de una célula huésped con una secuencia de nucleótidos que debe ser la diana o que debe expresar la diana. Las células huésped transformadas con la secuencia de nucleótidos pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada del cultivo celular. La proteína producida por una célula recombinante puede segregarse o puede contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector utilizado. Como comprenderán los expertos en la técnica, los vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirijan las secreción de las secuencias de codificación a través de una membrana celular procariótica o eucariótica particular. Otras estructuras recombinantes pueden unir la secuencia de codificación a la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de las proteínas solubles (Kroll D.J. et al, (1993), DNA Cell. Biol. 12:441-53).

## COMPOSICIONES FARMACEUTICAS

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo combinaciones de éstos).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria y comprenderá típicamente uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos o diluyentes para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen en, por ejemplo Pharmaceutical Sciences de Remington, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit., 1985). La selección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede hacerse con respecto a la vía prevista de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmaceúticas pueden comprender como vehículo, excipiente o diluyente, además de los

7252

mismos, cualquier ligante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento o agente(s) de solubilización.

Pueden proporcionarse conservantes, estabilizantes, tintes y agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido para-hidroxibenzoico. También pueden utilizarse antioxidantes y agentes de suspensión.

Puede haber diferentes requerimientos de composición/formulación dependiendo de los diferentes sistemas de suministro. Como ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para suministrarse utilizando una minibomba o por vía mucosa, por ejemplo en forma de un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o disolución ingerible, o parenteralmente, en la que la composición se formula en una forma inyectable para suministro, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Como alternativa, la formulación puede diseñarse para ser suministrada por ambas vías.

Cuando el agente se va a suministrar por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, debería ser capaz de permancer estable durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal, por ejemplo debería ser resistente a la degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos detersorios de la bilis.

Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inhalación, en forma de supositorio o de pesario, tópicamente en forma de una loción, disolución, crema, ungüento o polvo, utilizando un parche dérmico, oralmente en forma de comprimidos que contienen excipientes como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, disoluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse preferiblemente en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o monosacáridos suficientes para hacer la disolución isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas que pueden formularse de manera convencional.

Para algunas realizaciones, los agentes pueden utilizarse también en combinación con una ciclodextrina. Las ciclodextrinas se sabe que forman complejos de inclusión y de no inclusión con moléculas de medicamento. La formación de un complejo medicamento-ciclodextrina puede modificar las propiedades de solubilidad, velocidad de disolución, biodisponibilidad y/o estabilidad de una molécula de medicamento. Los complejos medicamento-ciclodextrina son generalmente útiles para la mayoría de las formas de dosificación y vías de administración. Como alternativa a la complejación directa con el medicamento, la ciclodextrina puede utilizarse como un aditivo auxiliar, por ejemplo como un vehículo, diluyente o solubilizante. Las alfa, beta y gammciclodextrinas son las utilizadas más habitualmente y se describen ejemplos adecuados en los documentos WO-A-91/11172, WO-A-94/02518 y WO-A-98/55148.

En una realización preferida, los agentes de la presente invención se suministran sistémicamente (como por vía oral, bucal, sublingual), más preferiblemente por vía oral.

Por ello, el agente está preferiblemente en una forma que es adecuada para suministro oral.

Para algunas realizaciones el agente, cuando se utiliza,

2255

preferiblemente no actúa sobre el sistema nervioso central.

Para algunas realizaciones el agente, cuando se utiliza, preferiblemente es de actuación periférica.

## ADMINISTRACION

El término "administrado" incluye el suministro por técnicas víricas o no víricas. Los mecanismos de suministro vírico incluyen, aunque no están limitados a ellos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores víricos de herpes, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos y vectores baculovíricos. Los mecanismos de suministro no vírico incluyen transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, compuestos anfifílicos faciales catiónicos (CFA) y combinaciones de éstos.

Los agentes de la presente invención pueden administrarse por separado, pero generalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, por ejemplo cuando el agente está mezclado con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable seleccionado con respecto a la vía prevista de administración y a la práctica farmacéutica estándar.

Pro ejemplo, el agente puede administrarse (por ejemplo oral o tópicamente) en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, por pulsos o controlada.

Los comprimidos pueden contener excipientes como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio y glicina, disgregantes como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos y ligantes de granulación como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además pueden incluirse agentes lubricantes como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para las suspensiones acuosas y/o elixires, el agente puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, material colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de éstos.

Las vías de administración (suministro) incluyen, aunque no están limitadas a las mismas, una o más de: oral (por ejemplo en forma de comprimido, cápsula o en forma de disolución ingerible), tópica, mucosa (por ejemplo en forma de pulverizador nasal o aerosol para inhalación), nasal, parenteral (por ejemplo en una forma inyectable), gastrointestinal, intraespinal, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intrauterina, intraocular, intradérmica, intracraneal, intratraqueal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutánea, oftálmica (incluyendo intravitreal o intracameral), transdérmica, rectal, bucal, vaginal, epidural y sublingual.

Se comprenderá que no todo el agente necesita administrarse por la misma vía. Probablemente, si la composición comprende más de un componente activo, esos componentes pueden administrarse por vías diferentes.

Si el agente de la presente invención se administra

2258

parenteralmente, los ejemplos de dicha administración incluyen uno o más de: administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intrasternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea del agente, y/o utilizando técnicas de infusión.

Para la administración parenteral, el agente se utiliza mejor en la forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo sales o glucosa suficiente para hacer la disolución isotónica con la sangre. Las disoluciones acuosas deberán estar adecuadamente tamponadas (preferiblemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se consigue fácilmente por ténicas farmacéuticas estándar conocidas por los expertos en la técnica.

Como se ha indicado, el agente de la presente invención puede administrarse intranasalmente o por inhalación y se suministra convenientemente en forma de una presentación de inhalador de polvo seco o de aerosol pulverizador de envase a presión, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un impulsor adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A™) o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA™), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la dosis unitaria puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. El envase a presión, bomba, pulverizador o nebulizador puede contener una disolución o un suspensión del compuesto activo, por ejemplo utilizado una mezcla de etanol y el impulsor como disolvente, que puede contener además un lubricante, por ejemplo trioleato de sorbitano. Las cápsulas y cartuchos (preparados por ejemplo a partir de gelatina) para uso en un inhalador o insuflador, pueden formularse para contener una mezcla de polvos del agente y una base en polvo adecuada como lactosa o almidón.

Como alternativa, el agente puede administrarse en forma de supositorio o de pesario, o puede aplicarse tópicamente en forma de un gel, hidrogel, loción, disolución, crema, ungüento o polvo. El agente puede administrarse también por vía dérmica o transdérmica, por ejemplo mediante el uso de un parche dérmico. También puede administrarse por vía pulmonar o rectal. También puede administrarse por vía ocular. Para uso oftálmico, los compuestos pueden formularse como suspensiones micronizadas en suero salino

2260

isotónico de pH ajustado o, preferiblemente, como disoluciones en suero salino estéril isotónico con pH ajustado opcionalmente, en combinación con un conservante como cloruro de bencilalconio. Como alternativa, puede formularse en forma de ungüento tal como vaselina.

Para la aplicación tópica a la piel, el agente puede formularse como un ungüento adecuado que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulsionadora y agua. Como alternativa, puede formularse como una loción o crema adecuada, suspendida o disuelta en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoesteraro de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de cetilésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por inyección directa.

Para algunas aplicaciones, el agente preferiblemente se administra oralmente.

2261

Para algunas aplicaciones, el agente preferiblemente se administra tópicamente.

NIVELES DE DOSIS

Típicamente, un médico determinará la dosificación real que será más adecuada para un sujeto individual. El nivel específico de dosis y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente en particular pueden variar y dependerán de una serie de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, modo y momento de administración, la tasa de excreción, la combinación de medicamentos, la gravedad de la dolencia particular y la terapia individual experimentada. El agente y/o composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse según un régimen de 1 a 10 veces al día, tal como una o dos veces al día.

Para administración oral y parenteral a pacientes humanos, el nivel de dosificación diario del agente puede ser en dosis simples o divididas.

Dependiendo de la necesidad, el agente puede administrarse

2262

a una dosis desde 0,01 a 30 mg/kg de peso corporal, tal como de 0,1 a 10 mg/kg, más preferiblemente de 0,1 a 1 mg/kg de peso corporal. Naturalmente, las dosificaciones mencionadas en la presente son ilustrativos del caso medio. Puede haber casos individuales, por supuesto, en que sean necesarios intervalos de dosificación mayores o menores.

## FORMULACION

El agente puede formularse en una composición farmacéutica, tal como por mezcla de uno o más vehículos, diluyentes o excipientes adecuados, mediante técnicas que son conocidas en la técnica.

A continuación se presentan algunos ejemplos no limitantes de formulaciones.

Formulación 1: Se prepara un comprimido utilizando los siguientes ingredientes:

| | peso/mg |
|---|---|
| Agente | 250 |
| Celulosa microcristalina | 400 |
| Dióxido de silicio, pirólisis | 10 |
| Acido esteárico | 5 |
| Total | 665 |

2263

se mezclan los componentes y se comprimen para formar comprimidos de 665 mg de peso cada uno.

Formulación 2: Una formulación intravenosa puede prepararse como sigue:

| | |
|---|---|
| Agente | 100 mg |
| Suero salino isotónico | 1.000 ml |

## SAL FARMACEUTICAMENTE ACTIVA

El agente puede administrarse como una sal farmacéuticamente aceptable. Típicamente, una sal farmacéuticamente aceptable puede prepararse fácilmente utilizando un ácido o base deseado, según sea apropiado. La sal puede precipitar de la disolución y recogerse por filtración o puede recuperarse por evaporación del disolvente.

## MODELOS DE ENSAYO ANIMAL

Pueden utilizarse modelos in vivo para investigar y/o diseñar terapias o agentes terapéuticos para tratar FSAD. Los modelos podrían utilizarse para investigar el efecto de diversas herramientas/compuestos líder sobre una serie de parámetros que indican la respuesta de excitación sexual. Estos modelos de ensayo animal pueden utilizarse como ensayo de la presente invención o en el mismo. El modelo de ensayo animal será un modelo de ensayo animal no humano.

Existe una serie de modelos animales para la disfunción sexual femenina vasculogénica (FSAD) disponibles que pueden utilizarse.

Como ejemplo, puede hacerse referencia a modelos animales invasivos (por ejemplo véase Park et al., 1997). En este caso, las respuestas hemodinámicas vaginal y clitorídea pueden registrarse directamente a continuación de la estimulación del nervio pélvico en conejos hembras normales y ateroscleróticos. Los efectos in vivo de los potenciadores de cAMP pueden investigarse en animales normales o con FSAD.

Como otro ejemplo, puede hacerse referencia a modelos animales no invasivos (por ejemplo véase la revisión de Goldstein et al., 1998, Laan et al., 1998). En este caso, la ultrasonografía de onda Doppler por pulsos proporciona el medio para detectar los cambios de flujo sanguíneo en las arterias vaginal y clitorídea. Este modelo puede utilizarse para investigar los efectos vasculogénicos durante la administración de vasodilatadores.

Otras técnicas no invasivas que pueden utilizarse incluyen fotopletismografía vaginal, que proporciona una medida cuantitativa de la congestión de la mucosa vaginal, y técnicas de compensación térmica vaginal, que están basadas en el principio de que los cambios en el flujo sanguíneo vaginal pueden registrarse midiendo la transferencia de calor de una sonda intravaginal mantenida a temperatura constante.

## UN MODELO ANIMAL DE EXCITACION SEXUAL

En los estudios de los presentes autores, se ha desarrollado un modelo reproducible y robusto de la fisiología de la excitación sexual. Este modelo utiliza un conejo anestesiado y emplea tecnologías de láser Doppler para monitorizar el flujo sanguíneo genital registrando rutinariamente los parámetros cardiovasculares. Se pueden de medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo vaginal (e incluso clitorídeo) inducidos por la estimulación del nervio pélvico o por infusión de VIP en ausencia y en presencia de los agentes de ensayo.

Se cree que dicho modelo animal refleja directamente los datos clínicos. Por ello, este modelo puede utilizarse para estudiar agentes candidatos para el tratamiento de FSAD, midiendo la estimulación del flujo sanguíneo vaginal o clitorídeo.

## MEDIDA FISIOLOGICA DE LA EXCITACION SEXUAL FEMENINA

Según la presente invención, pueden utilizarse una serie de técnicas diferentes para medir el flujo sanguíneo clitorídeo y vaginal. Como ejemplo, puede hacerse uso de fotopletismografía vaginal, técnica de eliminación del calor vaginal, MRI vaginal y clitorídeo de contraste mejorado, imágenes clitorídeas/vulvares por pulsos de láser Doppler y ultrasonografía clitorídea.

La cuantificación de la lubricación vaginal puede medirse también por técnicas conocidas en la técnica, como (a) pesados pre- y post-estimulación de tampones vaginales, y (b) medida del pH del fluido vaginal. Con respecto al último aspecto, el medio ácido normal en reposo en la vagina se hace más alcalino al acercarse al pH de la sangre cuando aparece la trasudación de fluido durante la estimulación sexual.

PDE (fosfodiesterasa)

Según un aspecto de la presente invención, la diana es una diana $P_{cAMP}$, siendo la diana $P_{cAMP}$ una PDE (fosfodiesterasa), siendo la PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

Se sabe que los nucleótidos cíclicos, como cAMP y cGMP, son importantes segundos mensajeros intracelulares. Las nucleótido cíclico fosfodiesterasas, también conocidas como PDE, son una familia de enzimas que catalizan la degradación de nucleótidos cíclicos y, al hacerlo, son uno de los componentes celulares que regulan la concentración de nucleótidos cíclicos.

En años recientes, se han definido al menos siete enzimas PDE (como PDEI - PDEVII), así como muchos subtipos de estas enzimas, basándose en la afinidad de sustrato y los requerimientos de cofactores (Beavo, J.A. y Reifsnyder, D.H., Trends Pharmacol. Sci. 11:150 (1990), Beavo, J., en: Cyclic Nucleotides Phosphodiesterases: Structure, Regulation and Drug Action, Beavo, J. y Housley, M.D. (Eds.) Wiley:Chichester, pág. 3-15 (1990).

Ejemplos de PDE incluyen: PDEI que es una PDE dependiente de $Ca^{2+}$/calmodulina, PDEII que es una PDE estimulada por cAMP y cGMP, PDEIII que es una PDE inhibida por cGMP, PDEIV que es una PDE de alta afinidad específica de cAMP y PDEV que es una PDE específica de cGMP. Las PDEI y restantes se denominan a veces PDE de tipo I, y restantes, o PDE de tipo 1, y restantes.

Cada familia de PDE puede contener dos o más isoformas (es decir puede haber dos o más isoenzimas PDE). Como ejemplo, la PDEIV de mamífero, la homóloga del gen Dunce de *Drosophila* (Chen, C.N. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (EE.UU.) 83:9313 (1986)) se sabe que tiene cuatro isoformas en rata (Swinnen J.V., et al., Proc. Nat. Acad. Sci. (EE.UU.) 86:5325 (1989)). Se sabe también que las PDE humanas aparecen como isoformas y que tienen variantes de corte y empalme. Por ejemplo, se informó de la clonación de una isoforma humana de PDEIV de monocitos en 1990 (Livi G.P. et al., Mol. Cell. Bio., 10:2678 [1990]). Como otro ejemplo, otros investigadores han clonado independientemente tres variantes de corte y empalme de PDEIV, que se designan ahora como hPDEIV-B1, hPDEIV-B2 y hPDEIV-B3.

Las explicaciones sobre nucleótido cíclico fosfodiesterasas pueden encontrarse también en los documentos US-A-5932423 y US-A-5932465.

Las explicaciones sobre otras nucleótido cíclico fosfodiesterasas, es decir CN PCDE8, pueden encontrarse en el documento WO-A-97/35989. Según el documento WO-A-97/35989, la CN PCDE8 tiene dos isoenzimas, que se designaron CN PCDE8A y CN PCDE8B. El término "isoenzima" se refiere a veces en la técnica como "isoforma".

Según el documento WO-A-97/35989, se han identificado muchos inhibidores de diferentes PDE y algunos han experimentado evaluación clínica. Por ejemplo, los inhibidores de PDEIII se están desarrollando como agentes antitrombóticos, como agentes antihipertensivos y como agentes cardiotónicos útiles en el tratamiento de insuficiencia cardiaca congestiva. Se ha utilizado rolipram, un inhibidor de PDEIII, en el tratamiento de la depresión y otros inhibidores de PDEIII están sometidos a evaluación como agentes antiinflamatorios. Se ha mostrado que el rolipram inhibe la TNF-alfa inducida por lipopolisacárido (LPS), que se ha mostrado que estimula la replicación de VIH-1 in vitro. Por lo tanto, el rolipram puede inhibir la replicación de VIH-1 (Angel et al., 1995, AIDS 9:1137-44). Además, basándose en su capacidad para suprimir la producción de TNF alfa y beta y del interferón gamma, el rolipram se ha mostrado eficaz en el tratamiento de encefalomielitis, el modelo animal experimental de esclerosis múltiple (Sommer et al., 1995, Nat. Med. 1:244-248) y puede ser eficaz en el tratamiento de disquinesia tardía (Sasaki et al., 1995, Eur. J. Pharmacol. 282:71-76).

Según el documento WO-A-97/35989, existen también inhibidores de PDE no específicos, como teofilina, utilizada en el tratamiento del asma bronquial y otras enfermedades respiratorias, y pentoxifilina, utilizada en el tratamiento de claudicación intermitente y enfermedades vasculares periféricas inducidas por la diabetes. La teofilina se cree que actúa sobre la función del músculo liso de las vías aéreas así como en una capacidad antiinflamatoria o inmunomodulatoria en el tratamiento de enfermedades respiratorias (Banner et al, 1995, Respir. J. 8:996-1000) donde se cree que actúa inhibiendo la hidrólisis tanto de cAMP CN PDE como de cGMP CN PDE (Banner et al., 1995, Monaldi Arch. Chest. Dis. 50:286-292). La pentoxifilina, también conocida por bloquear la producción de TNF-alfa, puede inhibir la replicación de VIH-1 (Angel et al, supra). Se da una lista de inhibidores de CN PDE en Beavo, 1995, supra.

Se ha sugerido que los inhibidores selectivos de PDE, además de sus isoenzimas y sus isotipos, conducirán a una terapia más eficaz con menos efectos secundarios. Por ejemplo, véanse las explicaciones de las revisiones de Wieshaar R.E., et al., (J. Med. Chem., 28:537[1985]), Giembycz M.A., (Biochem. Pharm., 43:2041 [1992]) y Lowe J.A. y Cheng J.B. (Drugs of the Future, 17:799-807 [1992]).

De esta manera, para algunas aplicaciones es deseable tener una inhibición selectiva de un tipo individual de PDE.

Las explicaciones de los antecedentes sobre las PDE han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a PDE2 o PDE estimulada por cGMP se ha extraído de esa fuente.

> "Los nucleótidos cíclicos funcionan como segundos mensajeros que median una serie de respuestas celulares ante señales extracelulares como hormonas, luz y neurotransmisores. Las nucleótido cíclico fosfodiesterasas nucleótidos cíclicos (PDE) juegan un papel en la transducción de la señal por regulación de las concentraciones celulares de los nucleótidos cíclicos. Las células de mamíferos contienen múltiples PDE que se distinguen en al menos 7

familias basadas en su afinidad de sustrato y en su sensibilidad selectiva hacia cofactores y medicamentos inhibidores. Estas familias son: (I) PDE dependientes de $Ca^{2+}$/calmodulina, (II) PDE estimuladas por cGMP, (III) PDE inhibidas por cGMP, (IV) PDE específicas de cAMP, (V) PDE específicas de cGMP, (VI) PDE fotoreceptoras y (VII) PDE de alta afinidad específicas de cAMP. A partir de la secuencia de aminoácidos, es evidente que todas estas familias de PDE contienen un dominio relacionado, que se piensa que es el dominio catalítico, con aproximadamente un 30% de identidad de secuencia entre las familias. Los miembros de la misma familia están relacionados más estrechamente, comparten el 60-80% de la identidad de secuencia a lo largo de toda la región de codificación.

Michaeli et al. (1993) establecieron un rastreo funcional altamente sensible para el aislamiento de cDNA que codifica cAMP fosfodiesterasas por complementación de los defectos en la cepa Saccharomyces cerevisiae que carece de ambos genes de cAMP PDE endógenos, PDE1 y PDE2. Se aislaron tres grupos de cDNA correspondientes a 3 genes humanos distintos que codificaban PDE específicas de cAMP a partir de una biblioteca de cDNA de glioblastoma humano utilizando este rastreo funcional. Dos de los genes estaban estrechamente relacionados con la PDE específica de cAMP "dunce" de Drosophila. El tercer gen, al que Michaeli et al. (1993) se refirieron como el HCP1, codificaba una nueva PDE específica de cAMP. HCP1 tenía una secuencia de aminoácidos relacionada con las secuencias de los dominios catalíticos de todas las nucleótido cíclico PDE. Es una PDE de alta afinidad específica de cAMP que no comparte otras propiedades de la familia de PDE específicas de cAMP, sin embargo. La actividad PDE de HCP1 no era sensible a cGMP u otros inhibidores de las PDE inhibibles por cGMP. Las propiedades bioquímicas y farmacológicas de HCP1 sugirieron a Michaeli et al. (1993) que era un miembro de una familia de nucleótido ciclico PDE no descubierta anteriormente, que se designó como la familia VII. Los análisis de transferencia Northern indicaron la presencia de altos niveles de RNA de HCP1 en músculo esquelético humano.

Por análisis de transferencia Southern de líneas celulares híbridas, Milatovich et al. (1994) mapearon el locus de HCP1 en el cromosoma 8, por estudio de las líneas celulares híbridas somáticas que contenían diferentes regiones del cromosoma 8, regionalizaron la asignación de 8q13-q22. Han et al. (1998) mapearon el gen PDE7A en 8q13 mediante fluorescencia de hibridación in situ. Por análisis retrocruzado interespecífico, mapearon el gen Pde7A de ratón en la región proximal del cromosoma 3."

Las explicaciones de los antecedentes sobre PDE2 han sido presentadas por Jennifer P. Macke et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a PDE2 estimulada por cGMP se ha extraido de esa fuente.

"Rosman et al. (1997) clonaron un cDNA correspondiente a PDE2A humana. El gen de PDE2A codifica un polipéptido de 941 aminoácidos con una masa molecular prevista de 106 kD. La secuencia de proteína es un 90% idéntica a las secuencias de PDE2A bovina y de rata. El análisis de transferencia Northern mostró que el PDE2A se expresaba como un mRNA de 4,2 kb a niveles variables en todos los tejidos humanos ensayados, con la gran excepción del cerebro. Los estudios de expresión revelaron que PDE2A hidroliza cAMP y cGMP y es inhibida por el inhibidor EHNA específico de PDE2A."

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de

2275

aminoácidos de las PDE están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En un aspecto, la diana PDE se selecciona de una o más de las siguientes enzimas PDE: $PDE_{cAMP}$ 1, $PDE_{cAMP}$ 2, $PDE_{cAMP}$ 3, $PDE_{cAMP}$ 4, $PDE_{cAMP}$ 7 y $PDE_{cAMP}$ 8.

En un aspecto más preferido, la diana PDE se selecciona de una o más de las siguientes enzimas PDE: $PDE_{cAMP}$ 1, $PDE_{cAMP}$ 2, $PDE_{cAMP}$ 3 y $PDE_{cAMP}$ 4.

Preferiblemente, para la presente invención, la PDE para la diana es al menos PDE2.

## I:PDE

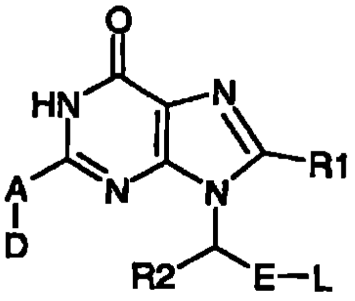
Como se ha indicado anteriormente, el agente adicional puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:PDE.

Ejemplos de I:PDE se describen en los documentos EP-A-091133 y EP-A-0771799.

Preferiblemente, el I:PDE es un I:PDE2. Así, los ejemplos de compuestos preferidos son los presentados en el documento EP-A-0771799.

Por conveniencia, la reivindicación 1 del documento EP-A-0771799 se repite ahora:

Un derivado de puri-6-ona de fórmula general (I):



en la que

| | |
|---|---|
| $R^1$ | representa hidrógeno o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono, |
| $R^2$ | representa un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono opcionalmente sustituido con hidroxilo, azido o un grupo |

de fórmula $-NR^3R^4$ o $-OSO_2R^5$, en la que

$R^3$ y $R^4$ son idénticos o diferentes y representan un cicloalquilo que contiene de 3 a 6 átomos de carbono, hidrógeno, formilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con un alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado, conteniendo respectivamente hasta 6 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $-(CO)_a-NR^6R^7$, en la que

a es el número 0 o 1,

$R^6$ y $R^7$ son idénticos o diferentes y representan hidrógeno, formilo, hidroxilo, fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con hidroxilo o un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, o

$R^3$ y/o $R^4$ representan un alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, un carboxilo o un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido con hidroxilo o un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, o

| | |
|---|---|
| $R^3$ y/o $R^4$ | representan un residuo de fórmula $-(CO)_b-T-NR^8R^9$, $-CO-R^{10}$, $-SO_2R^{11}$ o $-SO_2NR^{12}R^{13}$, en el que |
| b | tiene el significado dado anteriormente para a y es idéntico a éste o diferente de éste. |
| T | puede representar un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, o cuando b no es 0, puede representar también un enlace, |
| $R^8$ y $R^9$ | tienen el significado dado para los $R^6$ y $R^7$ anteriores y son idénticos a éstos o diferentes de éstos, |
| $R^{10}$ | representa un heterociclo saturado, parcialmente saturado o insaturado de 5 a 7 miembros que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, que también puede estar opcionalmente sustituido en la función N con un alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 4 átomos de carbono, carboxilo, benciloxicarboxilo o hidroxilo, |
| $R^{11}$ | representa un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, bencilo o fenilo, |

$R^{12}$ y $R^{13}$ son idénticos o diferentes y representan hidrógeno, fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 6 átomos de carbono, o

$R^3$ y $R^4$ junto con el átomo de nitrógeno forman un heterociclo saturado, parcialmente saturado o insaturado de 5 ó 6 miembros que puede contener hasta 3 heteroátomos seleccionados de N, S y/o O o un residuo $-NR^{14}$, y que está opcionalmente sustituido con carbonilo, un alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono que a su vez puede estar sustituido con hidroxilo, carboxi o un acilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contienen respectivamente hasta 6 átomos de carbono, en la que

$R^{14}$ representa hidrógeno, carbonilo o un alquilo o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 5 átomos de carbono, y

$R^5$ representa fenilo o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de

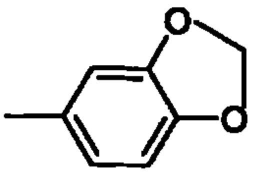
| | |
|---|---|
| | carbono, |
| A | representa una cadena alquileno o alquenileno lineal o ramificada que contiene respectivamente hasta 6 átomos de carbono, |
| D y L | son idénticos o diferentes y representan un arilo que contiene de 6 a 10 átomos de carbono o un heterociclo aromático de 5 a 7 miembros, opcionalmente benzocondensado, que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, opcionalmente sustituido hasta 3 veces con sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre halógeno, hidroxilo, nitro, trifluorometilo, carboxi, alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 6 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $-(v)_c-NR^{15}R^{16}$ y/o $-OR^{17}$, en la que |
| c | es el número 0 ó 1, |
| V | representa un residuo de fórmula -CO o $-SO_2$, |
| $R^{15}$ y $R^{16}$ | son idénticos o diferentes y tienen el significado dado para $R^3$ y $R^4$ anteriormente, |
| $R^{17}$ | representa hidrógeno, un alquenilo lineal |

o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono o un alquilo lineal o ramificado que contiene hasta 8 átomos de carbono, opcionalmente sustituido hasta 3 veces con sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre hidroxilo, carbonilo o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, y/o los ciclos están opcionalmente sustituidos con un arilo que contiene de 6 a 10 átomos de carbono o con un heterociclo aromático de 5 a 7 miembros, opcionalmente condensado a benceno, que contiene hasta 3 heteroátomos seleccionados de S, N y/o O, que está a su vez opcionalmente sustituido hasta dos veces con sustituyentes iguales o diferentes seleccionados entre halógeno, hidroxilo, nitro, carboxilo, trifluorometilo o un alquilo, alcoxi o alcoxicarbonilo lineal o ramificado que contiene respectivamente hasta 5 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $(V')_d$-$NR^{18}R^{19}$, en la que

d tiene el significado dado anteriormente para a y es idéntico a éste o diferente de

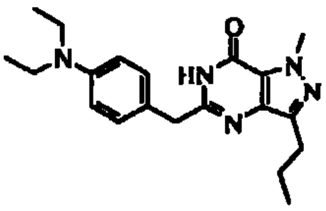
| | |
|---|---|
| | éste, |
| $R^{18}$ y $R^{19}$ | tienen el significado dado anteriormente para $R^3$ y $R^4$ y son idénticos a éstos o diferentes de éstos, |
| V' | tiene el significado dado anteriormente para V y es idéntico a éste o diferente de éste, y/o<br>representa el sistema de anillo dado a continuación para D, opcionalmente sustituido con un acilo lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono, opcionalmente sustituido con hidroxilo, un alcoxi lineal o ramificado que contiene hasta 5 átomos de carbono o con un grupo de fórmula $-NR^{20}R^{21}$, en la que |
| $R^{20}$ y $R^{21}$ | son idénticos o diferentes y tienen el significado dado anteriormente para $R^3$ y $R^4$,<br>o |
| E | representa un residuo de fórmula $-CH_2-Y-Z$, en la que |
| Y | representa un enlace o un átomo de oxígeno o azufre o el grupo -NH-, |
| Z | representa una cadena alquilo lineal o ramificada que contiene hasta 5 átomos de carbono, |

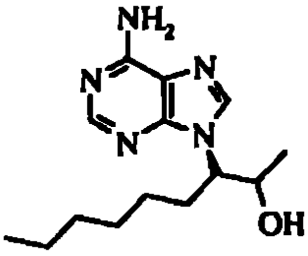
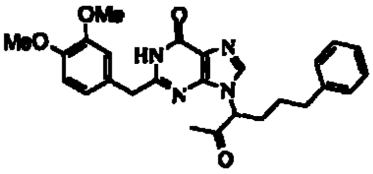
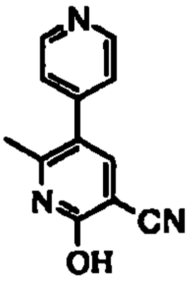
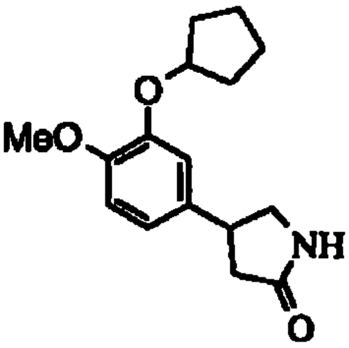
D representa un residuo de fórmula



y tautómeros y sales de éste.

Los I:PDE preferidos se seleccionan de las siguientes estructuras:

| **Compuesto** | **Estructura** | **Modo de acción**<br>**Referencias** |
|---|---|---|
| FIa |  | I:PDEI<br>EP-A-091133<br>(ejemplo 50) |

| | | |
|---|---|---|
| FIb |  | I:PDE2<br>EHNA (también un inhibidor de adenosíndesaminasa) |
| FII |  | I:PDE2<br>EP-A-0771799<br>(ejemplo 100) |
| FIII |  | I:PDE3<br>Milrinona<br>(que está comercialmente disponible) |
| FIV |  | I:PDE4<br>Rolipram<br>(que está comercialmente disponible) |

NEP (endopeptidasa neutra)

Según un aspecto de la presente invención, la diana adicional puede ser otra diana $P_{cAMP}$, como NEP.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de NEP están disponibles en la bibliógrafía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En un aspecto, NEP es NEP (EC 3.4.24.11) (también conocida como encefalinasa o endopeptidasa-2). En este caso, se ha encontrado mRNA de NEP EC 3.4.24.11 y proteína expresada en vagina humana y de conejo.

En este caso, creemos que en las hembras, incluyendo las que sufren FSAD, se degrada el VIP por la NEP EC3.4.24.11. De esta manera, los inhibidores de NEP potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del VIP liberado durante la excitación. Esto conducirá a un tratamiento de FSAD, tal como por medio de un aumento de la congestión vaginal. Se ha mostrado que los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 estimulan los aumentos del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal y clitorídeo) estimulados por el nervio pélvico e inducidos por VIP. Además, esos inhibidores selectivos de NEP estimulan la relajación mediada por VIP y por los nervios de la pared vaginal aislada.

Las explicaciones de los antecedentes de NEP han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a NEP se ha extraído de esa fuente.

> "El antígeno de la leucemia linfocítica aguda común es un marcador de superficie celular importante en el diagnóstico de la leucemia linfocítica aguda humana (ALL). Está presente en células leucémicas de fenotipo pre-B, que representan el 85% de los casos de ALL. La CALLA no está restringido sin embargo a las células leucémicas, y se encuentra en una serie de tejidos normales. La CALLA es una glicoproteína que es particularmente abundante en riñón, donde se presenta en el borde de cepillo de los túbulos proximales y en el epitelio glomerular. Letarte et el. (1988) clonaron un cDNA que codificaba CALLA y mostraron que la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de cDNA es idéntica a la de la endopeptidasa neutra humana asociada a membrana (NEP,

2287

EC 3.4.24.11), también conocida como encefalinasa. la NEP corta los péptidos en el extremo amino de los residuos hidrofóbicos e inactiva diversas hormonas peptídicas, incluyendo glucagón, encefalina, sustancia P, neurotensina, oxitocina y bradiquinina. Por análisis de transfección de cDNA, Shipp et al. (1989) confirmaron que CALLA es una endopeptidasa neutra funcional del tipo denominado anteriormente encefalinasa. Barker et al. (1989) demostraron que el gen CALLA, que codifica una glicoproteína transmembrana de tipo II de 100 kD, existe en una sola copia de más de 45 kD que no está reordenada como CALLA de superficie celular que expresa malignidades. Se localizó el gen en el cromosoma humano 3 por estudio de los híbridos celulares somáticos e hibridación in situ regionalizada en la localización 3q21-q27. Tran-Paterson et al. (1989) asignaron también el gen al cromosoma 3 por análisis de transferencia Southern de DNA de híbridos celulares somáticos humano-roedor. D'Adamio et al. (1989) demostraron que el gen CALLA abarca más de 80 kb y está compuesto por 24 exones".

I:NEP

Como se ha indicado anteriormente, el agente adicional puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:NEP. Además, o como alternativa, el agente de la presente invención puede actuar también como un I:NEP.

Los detalles de un sistema de ensayo adecuado para identificar y/o estudiar un I:NEP se presentan en la siguiente sección.

Los I:NEP se discuten en los siguientes artículos de revisión:

Pathol. Biol., 46(3), 1998, 191.
Curent Pharm. Design, 2(5), 1996, 443.
Biochem. Soc. Trans., 21(3), 1993, 678.
Handbook Exp. Pharmacol., 104/1, 1993, 547.
TiPS, 11, 1990, 245.
Pharmacol Rev., 45(1), 1993, 87.
Curr. Opin. Inves. Drugs, 2(11), 1993, 1175.
Antihypertens. Drugs, (1997), 113.
Chemtracts, (1997), 10(11), 804.
Zinc Metalloproteases Health Dis. (1996), 105.
Cardiovasc. Drug. Rev., (1996), 14(2), 166.
Gen. Pharmacol., (1996), 27(4), 581.

Cardiovasc. Drug Rev., (1994), 12(4), 271.

Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., (1995), 22(1), 63.

Cardiovasc. Drug Rev., (1991), 9(3), 285.

Exp. Opin. Ther. Patents (1996), 6(11), 1147.

Se describen I:NEP en los siguientes documentos:

EP-509442A
US-192435
US-4929641
EP-599444B
US-884664
EP-544620A
US-798684
J. Med. Chem. 1993, 3821.
Circulation 1993, 88(4), 1.
EP-136883
JP-85136554
US-4722810
Curr. Pharm. Design, 1996, 2, 443.
EP-640594
J. Med. Chem. 1993, 36(1), 87.
EP-738711-A
JP-270957
CAS nº 115406-23-0

2290

DE-19510566
DE-19638020
EP-830863
JP-98101565
EP-733642
WO9614293
JP-08245609
JP-96245609
WO9415908
JP05092948
WO-9309101
WO-9109840
EP-519738
EP-690070
J. Med. Chem. (1993), 36, 2420.
JP-95157459
Bioorg. Med. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65.

Los I:NEP preferidos se describen en los siguientes documentos:

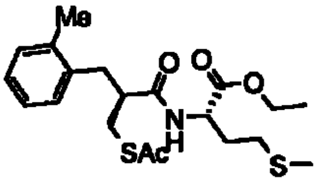
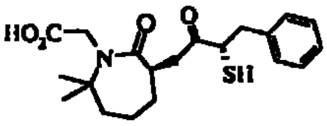
EP-A-0274234
JP-88165353
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, 164, 58
EP-629627-A

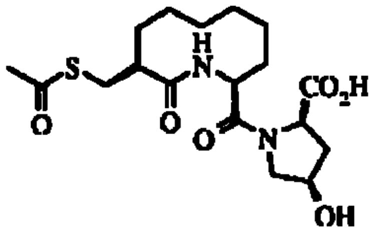
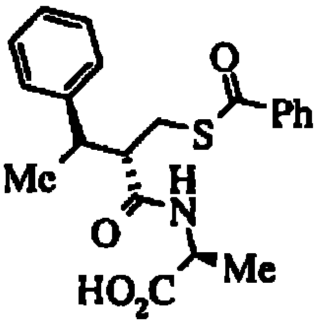
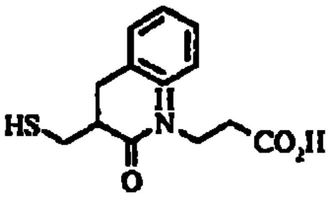
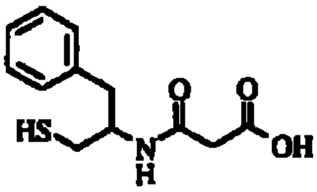
US-77978

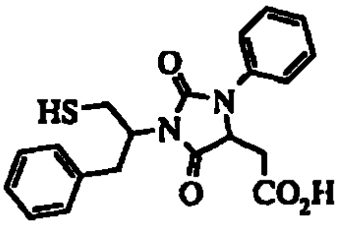
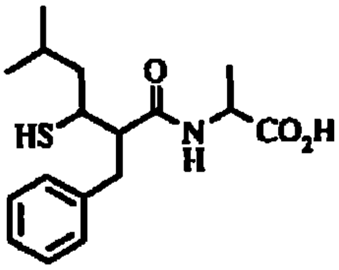
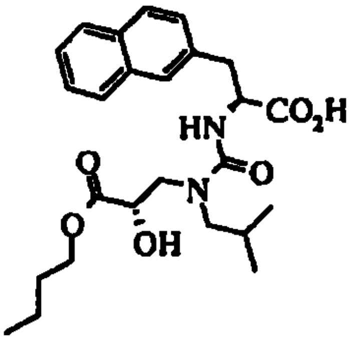
Perspect. Med. Chem. (1993), 45.

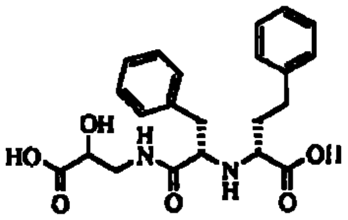
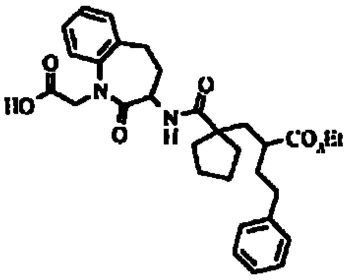
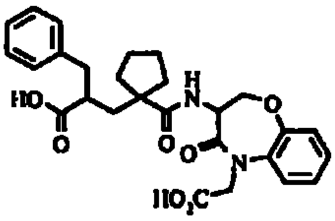
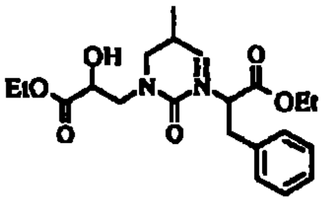
EP-358398-B

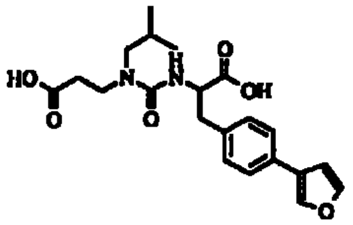
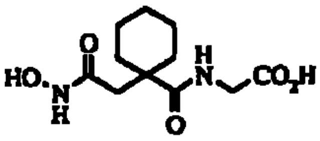
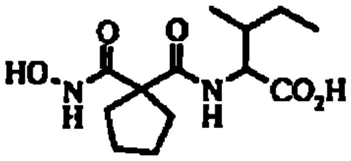
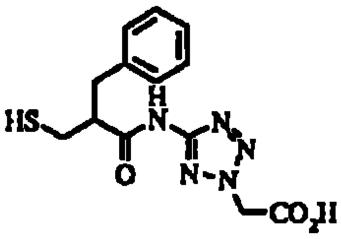
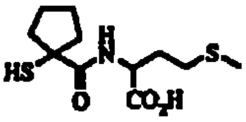
Los ejemplos preferidos de I:NEP se seleccionan de las siguientes estructuras:

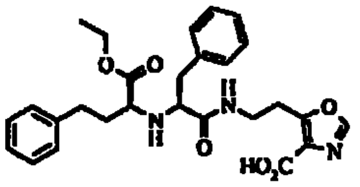
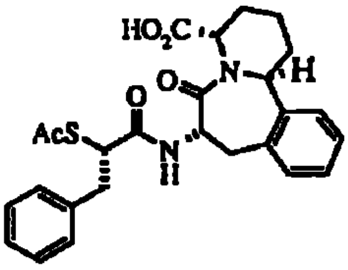
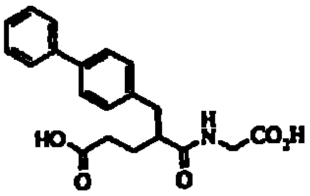
| Compuesto | Estructura | Modo de acción<br>Referencias |
|---|---|---|
| FXII |  | I:NEP<br>EP-509442A<br>US-192435<br>US-4929641 |
| FXIII |  | I:NEP<br>(también inhibidor de ACE)<br>EP-599444B<br>US-884664 |

| | | |
|---|---|---|
| FXIV |  | I:NEP<br>EP-544620A<br>Us-798684<br>J. Med. Chem.<br>1993, 3821 |
| FXV |  | I:NEP<br>(también un<br>inhibidor de ACE)<br>Mixanpril<br>Circulation 1993,<br>8(4), 1 |
| FXVI |  | I:NEP<br>EP-136883<br>JP-85136554<br>US-4722810 |
| FXVII |  | I:NEP<br>Retrothiorphan<br>Curr. Pharm.<br>Design, 1996, 2,<br>443. |

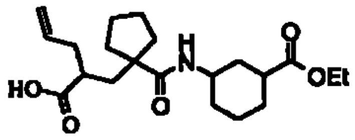
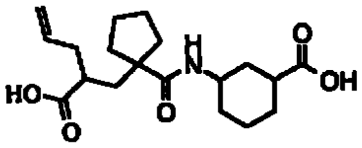
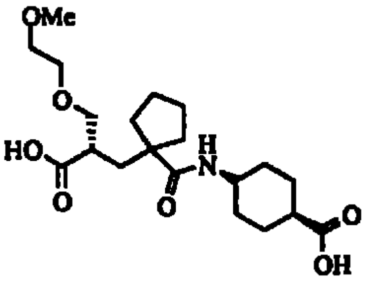
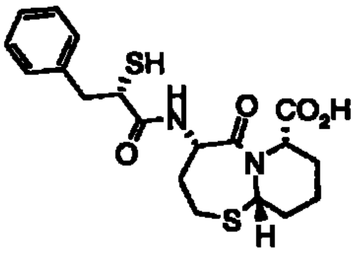
| | | |
|---|---|---|
| FXVIII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>EP-640594 |
| FXIX |  | I:NEP<br>J. Med. Chem. 1993, 36(1), 87 |
| FXX |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>EP-738711-A<br>JP-270957 |

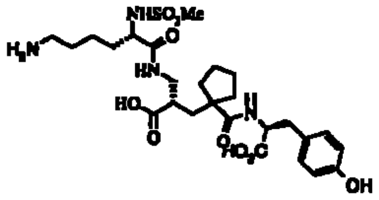
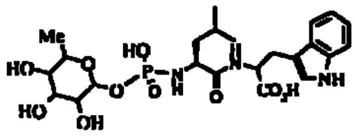
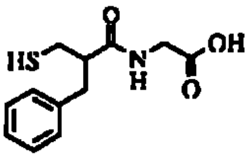
| | | |
|---|---|---|
| FXXI |  | I:NEP<br>n° CAS 115406-23-0 |
| FXXII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor de ACE)<br>DE-19510566<br>DE-19638020<br>EP-830863<br>JP-98101565 |
| FXXIII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>EP-733642 |
| FXXIV |  | I:NEP<br>WO96/14293 |

| | | |
|---|---|---|
| FXXV |  | I:NEP<br>JP-08245609<br>JP-96245609 |
| FXXVI |  | I:NEP<br>WO9415908 |
| FXXVII |  | I:NEP<br>JP5092948 |
| FXXVIII |  | I:NEP<br>WO-9309101 |
| FXXIX |  | I:NEP<br>WO-9109840 |

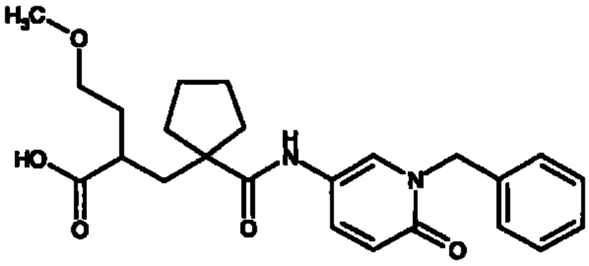
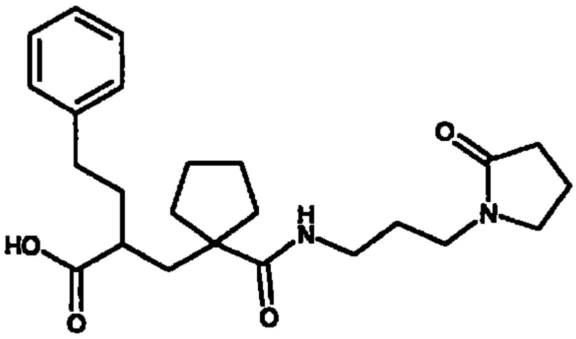
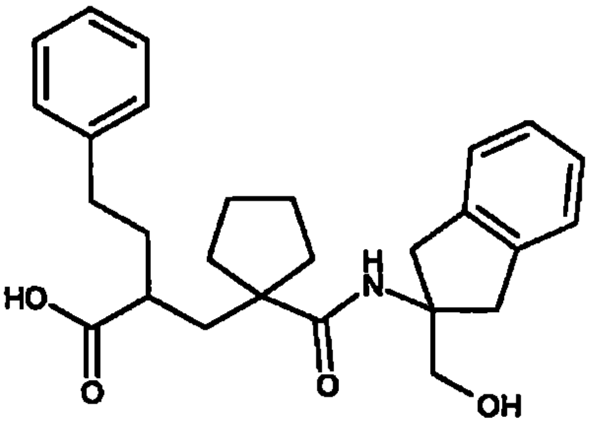
| | | |
|---|---|---|
| FXXXI |  | I:NEP<br>EP-519738<br>EP-690070 |
| FXXXII |  | I:NEP<br>(también un inhibidor ACE)<br>J. Med. Chem. (1993), 36, 2420. |
| FXXXIII |  | I:NEP<br>JP-95157459<br>Bioorg. MEd. Chem. Letts., 1996, 6(1), 65 |

Los I:NEP más preferidos se seleccionan de las siguientes estructuras:

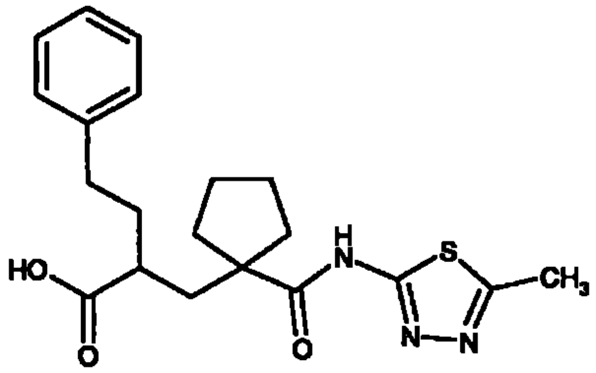
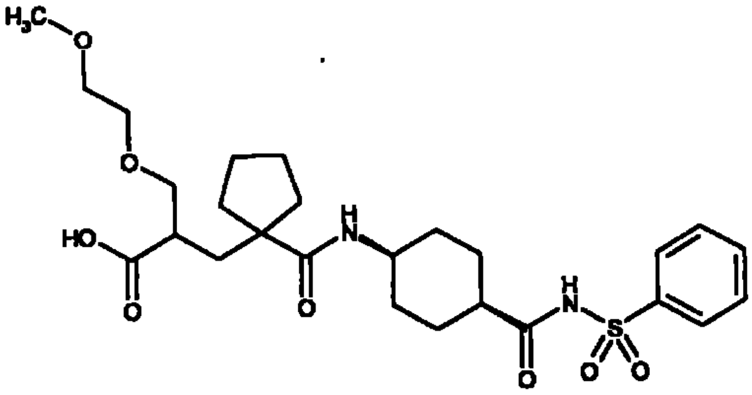
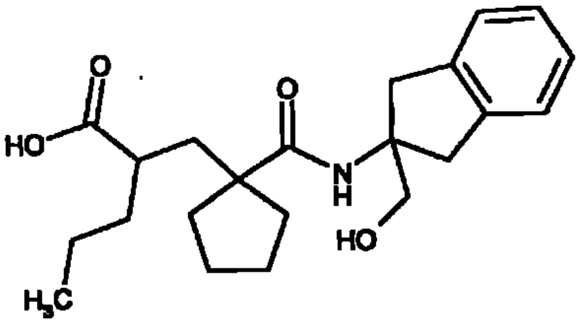
| **Compuesto** | **Estructura** | **Modo de acción**<br>**Referencias** |
|---|---|---|
| FV |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(ejemplo 300) |
| FVI |  | I:NEP<br>EP-A-0274234<br>(ejemplo 379) |
| FVII |  | I:NEP<br>Candoxatrilat<br>EP-274234<br>JP-88165353<br>Biochem. Biophys. Res. Comm., 1989, 164, 58. |
| FVIII |  | I:NEP<br>Omapatrilat<br>(también un inhibidor de ACE)<br>EP-0629627-A<br>US-77978 |

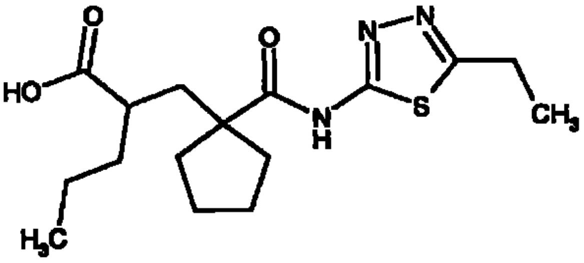
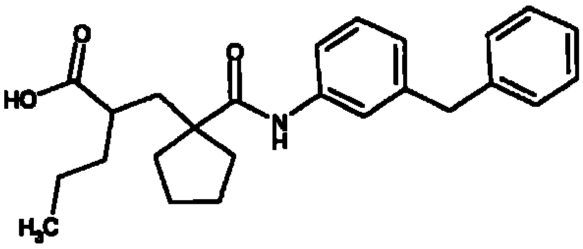
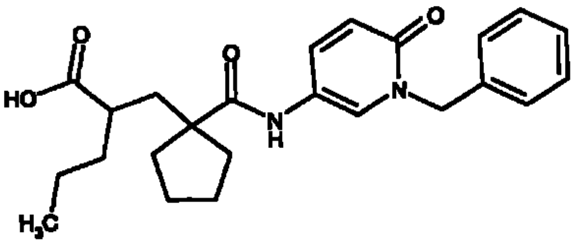
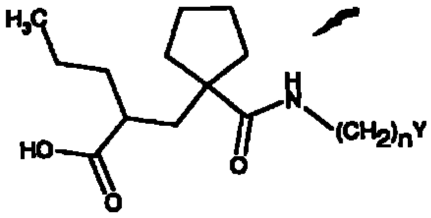
| | | |
|---|---|---|
| FIX |  | I:NEP<br>Sampatrilat<br>(también un inhibidor de ACE)<br>Perspect. Med. Chem. (1993), 45.<br>EP-0358398-B |
| FX |  | I:NEP<br>Fosforamidón<br>(que está comercialmente disponible) |
| FXI |  | I:NEP<br>Tiorfano<br>(que está comercialmente disponible) |

Los I:NEP más preferidos se seleccionan de las siguientes estructuras:

| COMPUESTO | ESTRUCTURA |
|---|---|
| F57 |  |
| F58 |  |
| F59 |  |

2300 ~~2301~~

| | |
|---|---|
| F60 |  |
| F61 |  H3C<br>O<br>O<br>HO<br>O<br>H<br>N<br>O<br>H<br>N<br>S<br>O<br>O<br>O |
| F62 |  |

| | |
|---|---|
| F63 |  |
| F64 |  |
| F65 |  |
| F66 | <br>(Ic) |

Estos compuestos se prepararon según las explicaciones presentadas en la sección experimental (a continuación). Se ensayaron estos compuestos como agentes y se encontraron útiles para potenciar el cAMP, y por lo tanto útiles para el tratamiento de FSAD. Algunos de los datos experimentales referentes a estos compuestos se presentan en la sección experimental (a continuación).

## ENSAYO NEP

### PREPARACION Y ENSAYO DE ENDOPEPTIDASA NEUTRA (NEP) SOLUBLE DE CORTEZA RENAL CANINA, DE RATA, DE CONEJO Y HUMANA.

Se obtiene la NEP soluble de corteza renal y se ensaya la actividad midiendo de la tasa de ruptura del sustrato NEP Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp para generar su producto fluorescente Abz-D-Arg-Arg.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 1. MATERIALES

Toda el agua se ha desionizado dos veces.

### 1.1. Tejidos

Riñón humano IIAM (Pennsylvania, EE.UU.)
Riñón de rata
Riñón de conejo
Riñón canino

1.2. Medio de homogeneización

Manitol 100 mM y Tris 20 mM a pH 7,1

2,42 g de Tris (Fisher T/P630/60) se diluyen en 1 litro de agua y se ajusta el pH a 7,1 utilizando HCl 6 M a temperatura ambiente. Se añade a ésto 18,22 g de manitol (Sigma M-9546).

1.3. Tampón tris (tampón NEP)

50 ml de Tris 50 mM a pH 7,4 (Sigma T2663) se diluyen en 950 ml de agua.

1.4. Sustrato (Abz-D-Arg-Arg-Leu-EDDnp)

Preparado por encargo en SNPE, almacenado en forma de polvo a -20°C. Se prepara una disolución madre 2 mM por resuspensión suave del sustrato en tampón Tris, éste no debe agitarse con vórtice ni sonicarse.

Se almacenan alícuotas de 600 μl de disolución madre 2 mM a -20 °C durante un periodo de hasta un mes (Medeiros, M.A.S., Franca, M.S.F. et al., (1997), Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 30, 1157-1162).

1.5. Producto total

Se incluyen en la placa muestras correspondientes a un 100% de conversión de sustrato a producto para posibilitar la determinación del % de producción del sustrato. Se genera el producto total por incubación de 1 ml de sustrato 2 mM con 20 µl de disolución madre de enzima durante 24 horas a 37°C.

1.6. Disolución de parada.

Se prepara una disolución madre 300 µM de fosforamidón (Sigma R7385) en tampón NEP y se almacena en alícuotas de 50 µl a -20°C.

1.7 Dimetilsulfóxido (DMSO)

1.8 Cloruro de magnesio, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Fisher M0600/53).

1.9 Placas de ensayo de fondo plano de 96 pocillos negras (Costar 3915).

1.10 Topseal A (Packard 6005185).

1.11. Tubos de centrífuga

2. **EQUIPAMIENTO ESPECIFICO**

2.1 Centrífuga Sorvall RC-5B (rotor SS34 GSA, preenfriada a 4°C).

2.2 mezclador Miniprimer Braun

2.3 Centrífuga Beckman CS-6R.

2.4 Fluostar galaxy

2.5 Incubador de agitación Wesbart 1589.

## 3. **PROCEDIMIENTOS**

### 3.1 PREPARACION DE TEJIDOS

3.2 Se obtienen NEP de perro, rata, conejo, y humana de corteza renal utilizando un procedimiento adaptado de Booth, A.G. & Kenny, A.J. (1974) *Biochem J.*, 142, 575-581.

3.3 Se dejan descongelar los riñones congelados a temperatura ambiente y se extraen las cortezas de la médula.

3.4 Se corta finamente en láminas la corteza y se homogeneiza en aproximadamente 10 volúmenes de tampón de homogeneización (1.2) utilizando un homogeneizador Braun (2.2).

3.5 Se añade cloruro de magnesio (1.8) (20,3 mg/g de tejido) al homogeneizado y se agita en baño de hielo durante 15 minutos.

3.6 Se centrifuga el homogeneizado a 1.500 g (3.820 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman (2.3) antes de extraer el sobrenadante a un tubo de centrífuga nuevo y descartar el sedimento.

3.7 Se centrifuga el sobrenadante a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Sorvall (2.1) y se descarta el sobrenadante.

3.8 Se extrae la capa rosa pálido de encima del sedimento restante y se resuspende en tampón de homogeneización que contiene cloruro de magnesio (9 mg de

2306

$MgCl_2$ en 5 ml de tampón por g de tejido).

3.9 Se centrifuga la suspensión a 2.200 g (4.630 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman (2.3) antes de descartar el sedimento.

3.10 Se centrifuga la suspensión a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos utilizando la centrífuga Sorvall (2.1) y se descarta el sobrenadante.

3.11 Se resuspende el sedimento final en tampón de homogeneización que contiene cloruro de magnesio (0,9 mg de $MgCl_2$ en 0,5 ml de tampón por g de tejido). Se obtiene una suspensión homogénea utilizando el mezclador Miniprimer Braun (2.2). Esta se congela a continuación en alícuotas de 100 $\mu$l para ensayar la actividad NEP.

## 4.0 DETERMINACION DE ACTIVIDAD NEP

Se mide la actividad de la NEP previamente dispuesta en alícuotas en función de su capacidad para cortar el sustrato peptídico específico de NEP.

4.1 Se prepara una disolución de DMSO al 4%/tampón NEP (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón NEP).

4.2 Se dejan las disoluciones madre de sustrato, producto total, enzima y fosforamidón en hielo para descongelar.

4.3 Se añaden 50 $\mu$l de disolución de DMSO al 4%/tampón NEP a cada pocillo.

4.4 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:40 para preparar una disolución 50 $\mu$M. Se añaden 100 $\mu$l de sustrato 50 $\mu$M a cada pocillo (concentración final 25 $\mu$M).

4.5 Se añaden 50 $\mu$l de un intervalo de diluciones de enzimas para iniciar la reacción (habitualmente se utilizan 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200). Se añaden 50 $\mu$l de tampón NEP a los pocillos blanco.

4.6 Se diluye el producto total 2 mM 1:80 para preparar una disolución 25 $\mu$M. Se añaden 200 $\mu$l de producto 25 $\mu$M a los cuatro primeros pocillos de una placa nueva.

4.7 Se incuban las placas a 37°C en un incubador de agitación durante 60 minutos.

4.8 Se diluye la disolución madre 300 $\mu$M de fosforamidón 1:100 a 300 nM. Se para la reacción por adición de 100 $\mu$l de fosforamidón 300 nM y se incuba a 37°C en un incubador de agitación durante 20 minutos antes de leer en un Fluostar (ex320, em420).

## 5. ENSAYOS DE INHIBICION DE NEP

5.1 Se dejan las disoluciones madre de sustrato, producto total, enzima y fosforamidón en hielo para descongelar.

5.2 Se preparan disoluciones madre del compuesto con DMSO al 100% y se diluyen 1:25 en tampón NEP proporcionando una disolución de DMSO al 4%. Todas las demás diluciones se llevan a cabo en disolución de DMSO al 4% (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón NEP).

5.3 Se añaden 50 µl de compuesto por duplicado a la placa de 96 pocillos y se añaden 50 µl de DMSO al 4%/tampón NEP a los pocillos de control y a los pocillos blanco.

5.4 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:40 en tampón NEP preparando una disolución 50 µM (275 µl de sustrato 2 mM para 10,73 ml de tampón es suficiente para una placa).

5.5 Se diluye la disolución madre de enzima en tampón NEP (determinado por las comprobaciones de actividad).

5.6 Se diluye la disolución madre de producto total 2 mM 1:80 en tampón NEP para preparar una disolución 25 µM. Se añaden 200 µl a los primeros cuatro pocillos de una placa por separado.

5.7 Se diluye la disolución madre de fosforamidón 300 µM 1:1000 para preparar una disolución madre 300 nM (11 µl de fosforamidón para 10,99 ml de tampón NEP).

5.8 Se añade a cada pocillo de la placa de 96 pocillos lo siguiente:

Tabla de reactivos a añadir a la placa de 96 pocillos.

| | Compuesto /DMSO | Tampón Tris | Sustrato | Enzima NEP | Producto total |
|---|---|---|---|---|---|
| Muestras | 2 µl de compuesto | 50 µl | 100 µl | 50 µl | Nada |
| Controles | 2 µl de DMSO | 50 µl | 100 µl | 50 µl | Nada |
| Blancos | 2 µl de DMSO | 100 µl | 100 µl | Nada | Nada |
| Totales | 2 µl de DMSO | Nada | Nada | Nada | 200 µl |

5.9 Se inicia la reacción por adición de la enzima NEP antes de incubar a 37°C durante 1 hora en un incubador de agitación.

5.10 Se para la reacción con 100 µl de fosforamidón 300 nM y se incuba a 37°C durante 20 minutos en un incubador de agitación antes de leer en el Fluostar (ex320/em420).

## 6. CALCULOS

Se determina la actividad de la enzima NEP en presencia y en ausencia del compuesto y se expresa como un porcentaje.

% de actividad control (rendimiento de la enzima)

$$\frac{\text{FU medias de los controles - FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales - FU medias de los blancos}} \times 100$$

% de actividad con inhibidor

$$\frac{\text{FU medias del compuesto - FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales - FU medias de los blancos}} \times 100$$

Actividad expresada como % del control:

$$\frac{\text{\% actividad con inhibidor}}{\text{\% actividad del control}} \times 100$$

Se ajusta una curva de dosis-respuesta sigmoidal para el % de actividades (% de control) frente a la concentración de compuesto y se calculan los valores de CI50 utilizando el ajuste de curvas LabStats en Excel.

NPY (neuropéptido Y)

Según un aspecto de la presente invención, la diana adicional es una diana $P_{cAMP}$, siendo $P_{cAMP}$ el NPY o uno de sus receptores asociados.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de NPY y sus receptores están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan el listado de secuencias proporcionado en la presente.

En este caso, se ha encontrado que el neuropéptido Y (NPY) ejerce una influencia reguladora inhibidora sobre la vasorrelajación mediada por el péptido intestinal vasoactivo (VIP). De esta manera, la inhibición de los receptores de NPY dará como resultado un aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo) mediado por el VIP y el nervio pélvico. Clínicamente, esto conducirá a un aumento de la congestión vaginal y/o clitorídea que conducirá en último término a un aumento de la lubricación a través de trasudación de plasma y a un aumento de la flexibilidad vaginal. Por ello, una diana adecuada, para el tratamiento de FSAD es NPY o uno de sus receptores asociados.

Así, en un aspecto preferido, el agente es un antagonista de NPY $Y_1$, $Y_2$ o $Y_5$, preferiblemente un antagonista oral de

NPY $Y_1$, $Y_2$ o $Y_5$. Este agente tratará el FSAD aumentando el flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal y clitorídeo) y aumentando la lubricación.

El antagonismo mediado por NPY de los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo representa, por lo tanto, una diana terapéutica potencial mediante la cual el flujo sanguíneo en el tracto genital femenino puede ser influenciado. El mecanismo a través del cual aparece este antagonismo es muy probablemente a través de activación $G_{i/o}$ inducida por el receptor de NPY $Y_1$. En otros sistemas fisiológicos, los receptores de NPY $Y_1$ han sido implicados en la mediación de la vasoconstricción y en la inhibición de la liberación de transmisores simpáticos (Lundberg et al., 1996, no puede excluirse un efecto de NPY $Y_2$). Si cree que el NPY inhibe la vasorrelajación en el tracto genital femenino mediante la inhibición directa de la adenilato ciclasa que inhibe directamente la liberación de VIP o la neurotransmisión simpática.

Como se ha indicado, un objetivo $P_{cAMP}$ es uno de los receptores de NPY.

La liberación neuronal de NPY regula la vasorrelajación inducida por VIP del lecho vascular vaginal. Esto ocurre muy probablemente a través de un mecanismo presináptico que implica a los receptores de NPY $Y_1$, aunque no puede excluirse un modo de acción post-sináptico. Un antagonista de NPY potenciará la vasodilatación inducida por VIP del lecho vascular vaginal. Clinicamente, esto conducirá a un aumento de la lubricación y de la flexibilidad vaginal a través de la congestión de la pared vaginal.

Los estudios de expresión del receptor de NPY realizados por los presentes anteriores han identificado los subtipos de receptor de NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$ dentro de la vagina humana.

Por ello, en un aspecto, la diana $P_{cAMP}$ es uno o más de los subtipos de receptores de NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$.

Las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido presentadas por Victor A. McKusick et al. en http://www3.ncbi. nlm.nih.gov/-Omim/searchomim.htm. La siguiente información referente a NPY se ha extraído de esa fuente.

> "El neuropéptido Y (NPY) es un péptido abundante y ampliamente extendido en el sistema nervioso de los mamíferos. Muestra homología de secuencia con el péptido YY y por encima del 50% de homología en la

23141

secuencia de aminoácidos y en la secuencia de nucleótidos con el polipéptido pancreático (PNP, 167780). El NPY es un péptido de 36 aminoácidos. Minth et al. (1984) clonaron el gen de NPY partiendo de mRNA de feocromocitoma. Takeuchi et al. (1985, 1986) aislaron clones de cDNA de los genes NPY y PNP a partir de un feocromocitoma y un tumor endocrino pancreático, respectivamente. Utilizando estas sondas de cDNA para analizar el DNA genómico de paneles de asignación cromosómica de híbridos celulares somáticos humano-ratón, examinaron después la cuestión de si los genes son sinténicos. Los estudios no mostraron sintenia, con NPY en 7pter-7q22 y con PNP en 17p11.1-17qter. Por estudios de retrocruzamiento con Mus spretus, Bahary et al. (1991) mapearon el gen homólogo de NPY en el cromosoma 6 de ratón. Puesto que el cromosoma 6 tiene homología con el 7q humano, es probable que el gen NPY en humano esté localizado en la región 7cen-q22. Meisler et al. (1987) excluyeron ligamientos cercanos entre los loci de la fibrosis cística (219700) y el neuropéptido Y. Terenghi et al. (1987) determinaron la distribución del mRNA que codifica el NPY en neuronas de la corteza cerebral en especímenes de biopsia quirúrgica y cerebro postmortem por medio de técnicas de hibridación in situ. Mostraron una localización consistente de la transcripción y expresión del gen NPY en neuronas corticales maduras normales. Baker et al. (1995) mostró por fluorescencia de hibridación in situ que el gen NPY está localizado en 7p15.1 y que existe en una sola copia. Comentaron que el NPY es uno de los péptidos más conservados conocidos con, por ejemplo, sólo 3 aminoácidos de diferencia entre humano y tiburón. El neuropéptido Y es un neuromodulador implicado en el control del equilibrio de energía y se sobreproduce en el hipotálamo de ratones ob/ob. Para determinar el papel de NPY en la respuesta a la deficiencia de leptina (164160), Erickson et al. (1996) generaron ratones ob/ob deficientes en NPY. En ausencia de NPY, los ratones ob/ob eran menos obesos debido a una menor ingestión de alimento y la mayor gasto de energía, y estaban afectados con una menor gravedad por diabetes, esterilidad y defectos somatrópicos. Estos resultados se interpretaron como indicadores de que NPY es un efector central de la deficiencia de leptina. Los análisis de ligamiento genético de ratas que se criaron selectivamente para mostrar una preferencia por el alcohol, identificaron una región cromosómica que incluía el gen NPY (Carr et al., 1998). Las ratas que prefieren alcohol tuvieron niveles menores de NPY en diversas regiones cerebrales comparadas con las ratas que no prefieren alcohol. Thiele et al. (1998) estudiaron por lo tanto el consumo de alcohol en ratones que carecían completamente de NPY como resultado de una alteración dirigida del gen (Erickson et al., 1996). Encontraron que los ratones deficientes en NPY mostraban un aumento del consumo, comparado con las ratones de tipo silvestre, de disoluciones que contenían etanol al 6%, 10% y 20% (en volumen). Los ratones deficientes en NPY eran también menos sensibles a los efectos sedantes/hipnóticos del etanol, como mostró una recuperación más rápida del sueño inducido por etanol, incluso aunque los niveles de etanol en plasma no diferían significativamente de los de los controles. En contraposición, los ratones transgénicos que sobreexpresaron un gen NPY marcado en neuronas que habitualmente lo expresan, tuvieron una menor preferencia por el alcohol y fueron más sensibles a los efectos sedantes/hipnóticos del etanol que los controles. Estos datos proporcionaron evidencias directas de que el consumo de alcohol y la resistencia son inversamente proporcionales a los niveles de NPY en el cerebro. Como parte de un

2317

estudio en marcha sobre la base genética de la obesidad, Karvonen et al. (1998) identificaron un polimorfismo 1128T-C que resultaba de la sustitución de leucina por prolina en el residuo 7 de la parte péptido señal de pre-pro-NPY. Este polimorfismo no estaba asociado a la obesidad o al metabolismo energético, pero estaba significativa y consistentemente asociado a altos niveles de colesterol total y colesterol LDL en suero tanto en sujetos finlandeses de peso normal y obesos como en holandeses obesos. Uusitupa et al. (1998) encontró el polimorfismo pro7 en el 14% de los finlandeses, pero sólo en el 6% de los holandeses. Los sujetos con pro7 en NPY tenían, de media, niveles de colesterol total en suero de 0,6 a 1,14 mmol/l mayores que aquellos sin esta variante del gen. Puesto que el impacto de pro7 NPY sobre los niveles de colesterol en suero no pudieron encontrarse en holandeses de peso normal, puede suponerse que las personas obesas son más susceptibles al efecto de la variante del gen. Se calculó que la probabilidad de tener el pro7 en NPY podría ser del orden del 50 o del 60% en sujetos obesos con un colesterol total en suero igual o superior a 8 mmol/l. Al menos entre los finlandeses, la forma pro7 de NPY es uno de los factores genéticos

2318

más potentes que afectan a los niveles de colesterol en suero. Véase también Allen y Bloom (1986), Dockray (1986), Maccarrone y Jarrott (1986), Minth et al. (1986)".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A: McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a NPYR1 se ha extraido de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY, 162640) es uno de los neuropéptidos más abundantse en el sistema nervioso mamífero y exhibe un variado intervalo de actividades fisiológicas importantes, incluyendo efectos sobre la actividad psicomotriz, ingestión de alimento, regulación de la secreción endocrina central y potentes efectos vasoactivos sobre el sistema cardiovascular. Se han definido dos grandes subtipos de NPY (Y1 e Y2) por criterios farmacólogicos. Los receptores de NPY Y1 se han identificado en una serie de tejidos, incluyendo cerebro, bazo, intestino delgado, riñón, testículos, placenta y músculo liso aórtico. El receptor Y2 se encuentra principalmente en el sistema nervioso central. Herzog et al. (1992) informaron de haber clonado un cDNA que codificaba un receptor de NPY humano del que confirmaron que era un miembro de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G. Cuando se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO) o células de riñón embrionario humano, el receptor exhibió características de especificidad de ligando. En la línea celular de riñón, el receptor se acopló a una proteína G sensible a la toxina pertussis que mediaba la inhibición de la acumulación de AMP cíclico. En la línea celular CHO, por otro lado, el receptor no se acopló a la inhibición de la adenilato ciclasa, sino a la elevación del calcio intracelular. De esta manera, el acoplamiento de segundo mensajero del receptor de NPY era específico del tipo celular, dependiendo del repertorio específico de proteínas G y de sistemas efectores presentes en el tipo de célula. Larhammar et al. (1992) clonaron independientemente y caracterizaron el receptor de neuropéptido Y. Herzog et al. (1993) determinaron la organización molecular y la regulación del gen del receptor de NPY Y1. En contraposición con la estructura contigua de la mayoría de los genes del receptor acoplados a proteína G, encontraron que el gen del receptor de NPY Y1 tiene 3 exones. Identificaron también un polimorfismo Pstl común en el primer intrón del gen. Por hibridación in situ con fluorescencia de alta resolución, localizaron el gen en 4q31.3-q32. Herzog et al. (1997) encontraron que los genes NPY1R y NPY5R (602001) están localizados conjuntamente en el cromosoma 4q31-q32. Los dos genes se transcriben en direcciones opuestas a partir de una región promotora común. Uno de los exones 5' alternativamente ligados al gen del receptor Y1 es una parte de la secuencia de codificación del receptor Y5. Esta infrecuente reordenación sugirió a Herzog et al. (1997) que los 2 genes surgieron por un fenómeno de duplicación del gen y que pueden expresarse coordinadamente. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Lutz et al. (1997) mapearon los genes Npy1r y Npy2r en grupos de ligamiento conservado en los cromosomas 8 y 3 de ratón, respectivamente, que corresponden con la región distal del cromosoma humano 4q".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre NPY y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibid.). El siguiente texto referente a NPYR2 se ha extraído de esa fuente.

"El neuropéptido Y (NPY) señala una familia de

2321

receptores acoplados a la proteína G presente en el cerebro y las neuronas simpáticas. Se han definido al menos 3 subtipos de receptor de neuropéptido Y sobre la base de criteria farmacológicos, distribución en tejido y estructura del gen de codificación, véanse 162641 y 162643. Rose et al. (1995) informaron de la clonación de expresión en células COS de un cDNA para el receptor tipo 2 humano, NPY2R. Las células transfectadas mostraron una alta afinidad por NPY (162640), el péptido YY (PYY, 600781) y un fragmento de NPY que incluía los aminoácidos 13 a 36. La proteína predicha de 381 aminoácidos prevista tiene 7 dominios transmembrana característicos de los receptores acoplados a la proteína G y es sólo un 31% idéntica al receptor Y1 humano (NPY1R, 162641). Se detectó un mRNA de 4 kb por transferencia Northern de muestras de tejido de diversas regiones del sistema nervioso. Gerald et al. (1995) clonaron el cDNA correspondiente al receptor Y2 de una biblioteca de expresión de cDNA de hipocampo humano utilizando un ensayo de unión de PYY marcado con radioisótopos. Expresaron el gen Y2 en células COS-7 y realizaron un ensayo de unión a hormona que mostró que el receptor Y2 se une (de mayor a menor afinidad) a las hormonas PYY, NPY y polipéptido pancreático (PP, 167780).

Ammar et al. (1996) clonaron y caracterizaron el gen humano que codifica el receptor de NPY de tipo 2. La copia abarca 9 kb de secuencia genómica y está codificada en 2 exones. Como en el gen del receptor de NPY de tipo 1, la región no traducida de 5' de NPY2R está interrumpida por una secuencia intermedia de 4,5 kb. Ammar et al. (1996) demostraron por análisis Southern de híbridos celulares roedor-humano seguido de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) que el gen NPY2R se mapea en 4q31, la misma región que contiene el gen NPY1R, sugiriendo que estos subtipos pueden haber surgido de la duplicación del gen a pesar de sus diferencias estructurales. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Lutz et al. (1997) mapearon los genes Npy1r y Npy2r en grupos de ligamiento conservado en los cromosomas 8 y 3 de ratón, respectivamente, que corresponden a la región distal del cromosoma humano 4q".

Se presenta un ensayo para determinar si un agente supuesto o real según la presente invención puede unirse a NPY en el documento WO-A-98/52890 (véase la página 96 de éste, líneas 2 a 28).

I:NPY

2323

Como se ha indicado anteriormente, el agente puede ser cualquier agente adecuado que pueda actuar como un I:NPY (a veces denominado antagonista de NPY). Además, o como alternativa, el agente de la presente invención puede actuar también como un I:NPY.

Se discuten I:NPY (en particular antagonistas de NPY) en los siguientes artículos de revisión:

Dunlop J., Rosenzweig-Lipson, S.: Therapeutic approaches to obesity, Exp. Opin. Ther. Pat. 1999, 8, 12, 1683-1694.

Wang S., Ferguson K.C., Burris T.P., Dhurandhar N.V.: 8th annual international conference on obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus: novel drug developments. Exp. Opin. Invest. Drugs 1999, 8, 7, 117-1125.

Ling A.L.: Neuropeptide Y receptor antagonists. Exp. Opin. Ther. Pat. 1999, 9, 4, 375-384. Adham N., Tamm J., Du P., Hou C., et al: Identification of residues involved in the binding of the antagonist SNAP 6608 to the Y5 receptor. Soc. Neurosci.Abstr. 1998, 24, parte 2, 626.9.

Shu Y.Z., Cutrone J.Q., Klohr S.E., Huang S.: BMS-192548, a tetracyclic binding inhibitor of neuropeptide Y

0324

receptors, from Aspergillus niger. WB2346. II. Physico-chemical properties and structural characterization. J. Antibiot. 1995, 48, 10, 1060-1065.

Rigollier P. Rueger H., Whitebread S., Yamaguchi Y., Chiesi M., Schilling W., Criscione L.: Synthesis and SAR of CGP 71683A, a potent and selective antagonist of the neuropeptide Y Y5 receptor. Int. Symp. Med. Chem., 1998, 15th Edinburgo, 239.

Criscione L., Rigollier P., Batzl-Hartmann C., Rueger H., Stricker-Krongrad A., et al: Food Intake in free-feeding and energy-deprived lean rats is mediated by the neuropeptide Y5 receptor. J. Clin. Invest. 1998, 102, 12, 2136-2145.

Neurogen Corp: NGD 95-1. Clin. Trials Monitor. 1996, 5, 10, Ab 19244.

Buttle L.A.: Anti-obesity drugs: on target for huge market sales. Exp. Opin. Invest. Drugs 1996, 5, 12, 1583-1587.

Gehlert D.R., Hipskind, P.A.: Neuropeptide Y receptor antagonists in obesity. Exp. Opin. Invest. Drugs, 1996, 7, 9, 1827-1838.

Goldstein D.J., Trautmann M.E.: Treatments for obesity. Emerging Drugs, 1997, 2-1-27.

Hipskind P.A., Lobb K.L., Nixon J.A., Britton T.C., Bruns R.F., Catlow J., Dieckman McGinty D.K., Gackenheimer S.L., Gitter B.D., Iyengar S., Schober D.A. et al: Potent and selective 1,2,3-trisubstituted indole NPY Y-1 antagonists. J. Med. Chem. 1997, 40, 3712-3714.

Zimmerman D.M., Cantrall B.E., Smith E.C.R., Nixon J.A., Bruns R.F., Gitter B., Hipskind P.A., Ornstein P.L., Zarrinmayeh H., Britton T.C., Schober D.A., Gehlert D.R.: Structure-activity relationships of a series of 1-substituted-4-methilbenzimidazole neuropeptide Y-1 receptor antagonists. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1998, 8, 5, 473-476.

Zarrinmayeh H., Nunes A., Ornstein P., Zimmerman D., Arnold M.B., et al.: Synthesis and evaluation of a series of novel 2-[(4-chlorophenoxy)methyl]benzimidazoles as selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. J. Med. Chem. 1998, 41, 15, 2709-2719.

Britton T.C., Spinazze P.G., Hipskind P.A., Zimmerman D.M., Zarrinmayeh, H., Schober D.A., Gehlert D.R., Bruns R.F.:

Structure-activity relationships of a series of benzotiophene-derived NPY-Y1 antagonists: optimization of the C2 side chain. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1999, 3, 475-480.

Zarrinmayeh H., Zimmerman D.M., Cantrell B.E., Schober D.A., Bruns R.F., Gakenheimer S.L., Ornstein P.L., Hipskind P.A., Britton T.C., Gehlert D.R.: Structure-activity relationship of a series of diaminoalkyl substituted benzimidazole as neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. Bioorganic, Med. Chem. Lett. 1999, 5, 647-652.

Murakami Y., Hara H., Okada T., Hashizume S., Kii, M., Ishihara, Y., Ishikawa, M., Mihara, S-I., Kato, G., Hanasaki, K., Hagishita, S., Fujimoto M.: 1,3-disubstituted benzazepines as novel, potent, selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonists. J. Med. Chem. 1999, 42, 14, 2621-2632.

Rudolf K., Eberlein W., Engel W., Wieland H.A., Willim K.D., Entzeroth M., Wienen W., Beck Sickinger A.G., Doods, H.N.: The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur. J. Pharmacol. 1994, 271, 2-3, R11-R13.

Wieland H.A., Willim K.D:, Entzeroth M., Wienen W., Rudolf K., Eberlein W. Engel W., Doods H.N.: Subtype selectivity and antagonist profile of the nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1995, 275, 1, 143-149.

Wright J., Bolton G., Creswell M., Downing D., Georgic L., Heffner T., Hodges J., MacKenzie R., Wise L.: 8-amino-6-(arylsulphonyl)-5-nitroquinolones: novel nonpeptide neuropetide Y1 receptor antagonists. Bioorganic. Med. Chem. Lett. 1996, 6, 15, 1809-1814.

Capurro D., Huidobro-Toro J.P.: The involvements of neuropeptide Y Y1 receptors in the blood pressure baroreflex: studies with BIBP 3226 and BIB 3304. Eur. J. Pharmacol. 1999, 376, 3., 251-255.

Dumont Y., Cadieux A., Doods H., Quirion R.: New tools to investigate neuropeptide Y receptors in the central and peripheral nervous systems: BIBO-3304 (Y1), BIIE-246 (Y2) y [125I]-GR-231118 (Y1/Y4). Soc. Neurosci. Abstr. 1999, 25, parte 1, Aptdo. 74.11.

Hedge S.S., Bonhaus D.W., Stanley W., Eglen R.M., Moy T.M., Loeb M., et al.: Pharmacological evaluation of 1229U91, a high affinity and selective neuropeptide Y(NPY)-Y1 receptor antagonist. Pharmacol. Res. 1995, 31, 190.

Matthews J.E., Chance W.T., Grizzle M.K., Heyer D., Daniels A.J.: Food intake inhibition and body weight loss in rats treated with GI 264879A, an NPY-Y1 receptor. Soc. Neurosci. Abstr. 1997, 23, parte 2, 1346.

Doods H.N., Willim K-D., Smith S.J.: BIBP 3226: a selective and highly potent NPY-Y1 antagonist. Proc. Br. Pharmacol. Soc. 1994, 13-16, Dec. C47.

Rudolf K., Eberlein, W., Engel W., Wieland H.A., Willim K.D., Entzeroth M., Wienen W., Beck Sickinger A.G., Doods H.N.: The first highly potent and selective non-peptide neuropeptide YY1 receptor antagonist: BIBP3226 Eur. J. Pharmacol. 1994, 271, 2-3, R11-R13.

Serradelil-Le-Gal C., Valette G., Rouby P.E., Pellet A., Villanova G., Foulon L., Lespy L., Neliat G., Chambon J.P., Maffrand J.P., Le-Fur G.: SR 120107A y SR 120819A: Two potent and selective, orally-effective antagonists for NPY Y1 receptors. Soc. Neurosci. Abstr. 1994, 20, parte 1, 907, Aptdo. 376.14.

Hong Y., Gregor V., Ling A.L., Tompkins E.V., Porter J. Chou T.S., Paderes G., Peng Z., Hagaman C., Anderes K., Luthin D., May J.: Synthesis and biological evaluation of novel guanylurea compounds as potent NPY Y1 receptor antagonist. Acs 1999, 217, Anaheim MEDI 108.

Se describen I:NPY (en particular antagonistas de NPY) en los siguientes documentos:

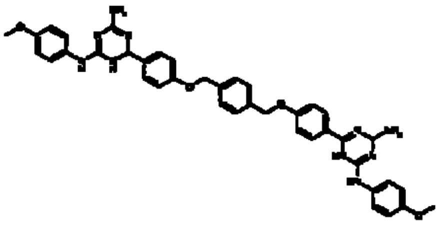
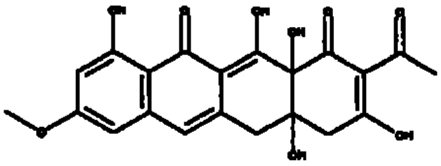
WO-98/07420
WO-94/00486
WO-96/22305
WO-97/20821
WO-97/20822
WO-96/14307
JP-07267988
WO-96/12489
US-5552422
WO-98/35957
WO-96/14307
WO-94/17035
EP-0614911
WO-98/40356
EP-0448765
EP-0747356

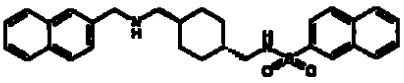
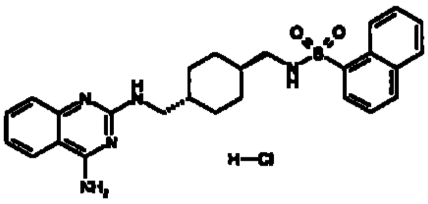
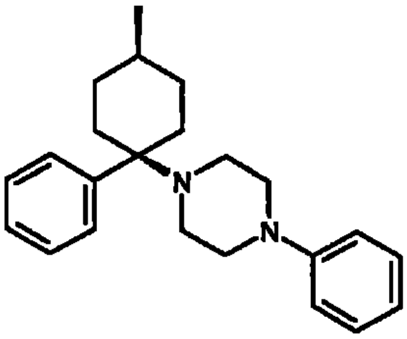
WO-98/35941

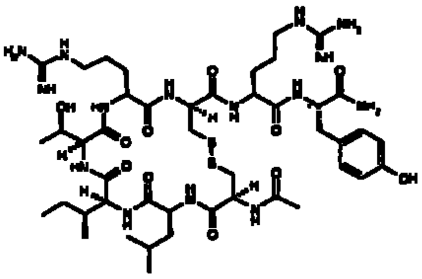
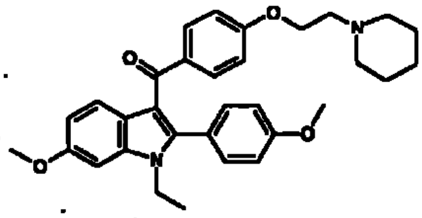
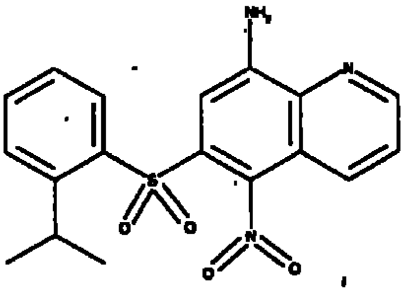
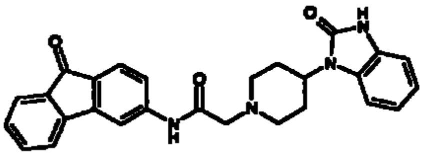
WO-97/46250

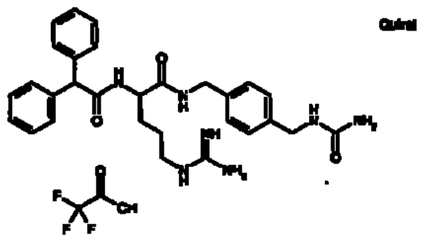
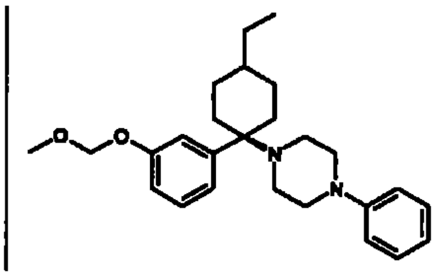
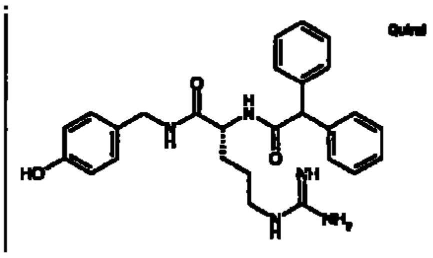
EP-0747357

Los ejemplos preferidos de I:NPY se seleccionan de las siguientes estructuras. Estos compuestos se ensayaron y se encontraron útiles para potenciar el cAMP, siendo por ello útiles en el tratamiento de FSAD. Algunos de los datos experimentales referentes a estos compuestos se presentan en la sección experimental (a continuación).

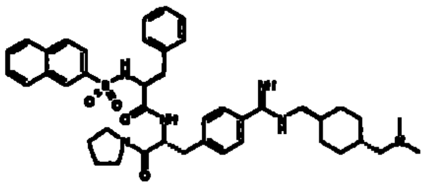
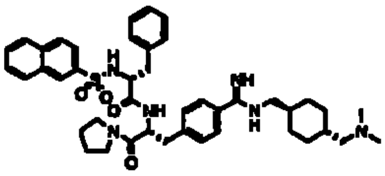
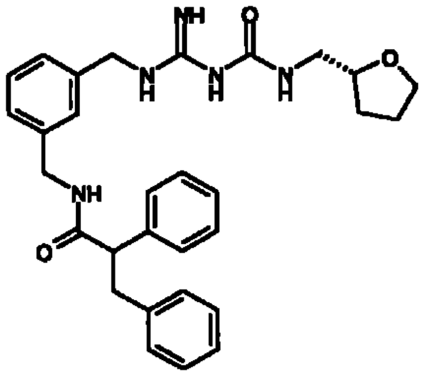
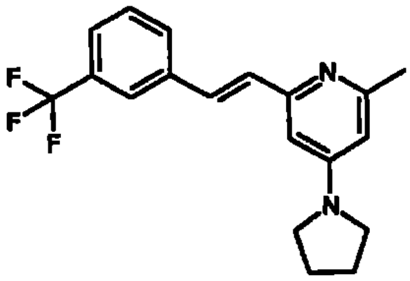
| Compuesto | Estructura | Modo de acción<br>Referencias |
|---|---|---|
| F34 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/07420<br>Ref. 3 |
| F35 |  | I:NPY<br>Ref. 5 |

| | | |
|---|---|---|
| F36 |  | I:NPY Y5<br>Ref 1,4 |
| F37 | dímero (2,2'),(4,4')-disulfuro cíclico Ile-Cys-Pro-Cys-Tyr-Arg-Leu-Arg-Tyr-NH2 | I:NPY Y1<br>WO-94/00486<br>WO-96/22305<br>Ref. 1, 2, 23 |
| F38 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/20821<br>WO-97/20822<br>Ref. 1, 3, 6, 7 |
| F39 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref. 1, 8, 9, 10, 11 |

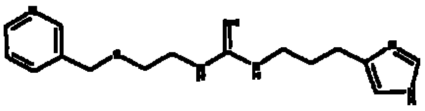
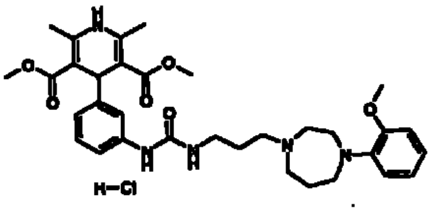
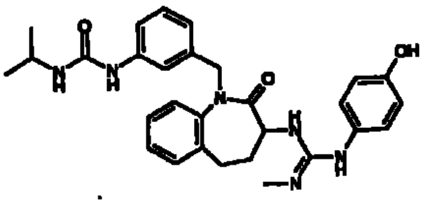
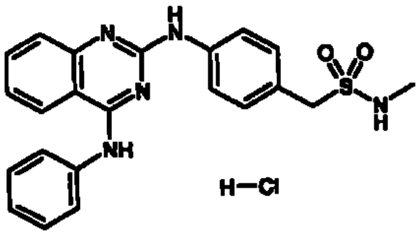
| | | |
|---|---|---|
| F40 |  | I:NPY Y1<br>JP-07267988<br>Ref. 1 |
| F41 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/12489<br>Ref. 3, 12, 13,<br>14, 15, 16, 17 |
| F42 |  | I:NPY Y1<br>US-5552422<br>Ref. 17, 18, 19,<br>20 |
| F43 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/35957<br>Ref. 3 |

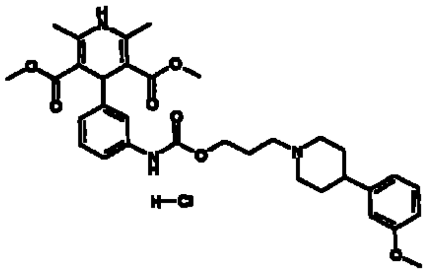
| | | |
|---|---|---|
| F44 |  | I:NPY Y1<br>Ref. 21, 22 |
| F45 |  | I:NPY Y1<br>WO-96/14307<br>Ref. 3 |
| F46 | Para la fórmula véase la referencia | I:NPY Y1<br>Ref. 24 |
| F47a |  | I:NPY Y1<br>WO-94/17035<br>Ref. 3, 17, 15, 26 |
| F47b | Para la fórmula véase la referencia | I:NPY Y1<br>Ref. 3, 12, 13, 14, 15, 16, 17 |

2334

| | | |
|---|---|---|
| F48 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref. 27 |
| F49 |  | I:NPY Y1<br>EP-0614911<br>Ref 27. |
| F50 |  | I:NPY Y1<br>Ref. 28 |
| F51 |  | I:NPY Y5<br>WO-98/40356 |

2335

| | | |
|---|---|---|
| F52 |  | I:NPY<br>EP-0448765 |
| F53 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747356 |
| F54 |  | I:NPY Y1<br>WO-98/35941 |
| F55 |  | I:NPY Y5<br>WO-97/46250 |

| | | |
|---|---|---|
| F56 |  | I:NPY Y1<br>EP-0747357 |

VIP (péptido intestinal vasoactivo)

Según un aspecto de la presente invención, una diana adicional es una diana $P_{cAMP}$, siendo la diana $P_{cAMP}$ VIP o uno de sus receptores asociados. La clasificación/nomenclatura actual se refiere a estos como VPAC1, VPAC2 y PACAP.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos para VIP y sus receptores están disponibles en la bibliografía. Algunas secuencias se presentan en el listado de secuencias proporcionado en la presente.

Hemos mostrado que VPAC1 y VPAC2 están presentes en la vagina humana y en la de conejo. PACAP estaba ausente tanto en la vagina de conejo como en la humana.

VIP es un importante neurotransmisor endógeno liberado

2339

durante la excitación sexual que es responsable de la vasodilatación vaginal inducida por el nervio del lecho vascular localizado en la pared vaginal. Estos efectos vasodilatadores están mediados por la activación de adenilato ciclasa y la producción de cAMP. Sin pretender limitarse a la teoría, este efecto puede estar mediado a través de receptores de VIP subtipos $VPAC_1$, $VPAC_2$ o PACAP (péptido activador de la adenilato ciclasa en la pituitaria). Los receptores $VPAC_2$ y PACAP son los más ampliamente extendidos en el SNC y estos receptores, a pesar de expresarse en la pituitaria, parecen no tener una función biológica extendida.

El agente podría potenciar el VIP y/o actuar como un mimético o análogo de éste. El agente potenciaría entonces y/o imitaría los efectos vasorrelajantes del VIP endógeno liberado durante la excitación sexual. El agente puede tener también un efecto aditivo sobre la relajación del músculo liso vaginal inducida por VIP. Clínicamente, esto conducirá al tratamiento de FSAD mediante el aumento de la lubricación vaginal a través de la congestión y flexibilidad de la pared vaginal. En esta realización, el mimético o análogo no tendría, sin embargo, las propiedades adversas de VIP como se han discutido anteriormente.

2338

Las explicaciones de los antecedentes sobre VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/-searchomim.htm. La siguiente información referente al VIP se ha extraído de esa fuente.

> "El péptido intestinal vasoactivo (VIP), un péptido de 28 aminoácios aislado originalmente de duodeno porcino, está presente no sólo en tejidos gastrointestinales sino también en tejidos neuronales, posiblemente como neurotransmisor, y exhibe una amplia variedad de acciones biológicas. Debido a que el VIP muestra similitudes con el glucagón, la secretina y el péptido inhibitorio gástrico (GIP), se ha considerado un miembro de la familia de glucagón-secretina. El producto primario de traducción del mRNA que codifica el VIP (prepro-VIP) tiene un peso molecular de 20 dalton. Por clonación de la secuencia de DNA complementaria al mRNA que codifica el VIP humano, Itoh et al. (1983) encontraron que el precursor de VIP contiene no sólo el VIP sino también un nuevo péptido de 27 aminoácidos, designado como PHM27, que tiene histidina aminoterminal y metionina carboxiterminal. Difiere del PHI17 aislado de intestino porcino en 2

aminoácidos, el PHI27, como su designación indica, tiene isoleucina carboxiterminal. Linder et al. (1987) aislaron el gen humano de VIP y PHM27 y estudiaron su expresión en diversos tejidos de rata. Heinz-Erian et al. (1985) sugirieron que la deficiente innovación de las glandulas sudoríparas de los pacientes con fibrosis quística por el neuropéptido VIP podría ser un mecanismo básico de reducción del contenido de agua y de impermeabilidad relativa del epitelio al cloruro y a otros iones que caracteriza a la fibrosis quística. Para comprobar esta hipótesis, Gozes et al. (1987) adoptaron el enfoque de "gen candidato". Bodner et al. (1985) habían mostrado que el VIP y el PHM-27 están codificados por exones adyacentes. Gozes et al. (1985) utilizaron el fragmento genómico de codificación de PHM-27 para detectar la presencia del gen VIP en 6q21-qter. De esta manera, eliminaron un gen deficaz de VIP como candidato a causa primaria de fibrosis quística (que está codificada en el cromosoma 7). Por técnicas de hibridación in situ, Gozes et al. (1987) asignaron el gen VIP a 6q24. Esto colocó a VIP en la región de MYB (189990), que se ha mapeado en 6q22. Gozes et al. (1987) investigaron una relación funcional entre los 2 genes en tejido neuronal. Observaron un pico agudo de mRNA de MYB en el hipocampo de ratas de 3 días de edad, antes del pico de mRNA de VIP que aparece en este área a los 8 días de edad. Omary y Kagnoff (1987) encontraron receptores nucleares para el VIP en una línea celular de adenocarcinoma colónico humano. Gotoh et al. (1988) asignaron el VIP al cromosoma 6 por hibridación de transferencia de manchas de un fragmento clonado molecularmente del gen a cromosomas clasificados. La localización se refinó a 6q26-q27 por hibridación in situ".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre el VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a VIPR1 o VPAC1 se ha extraido de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP, 192320) es un mediador neuroendocrino octacosamérico encontrado principalmente en neuronas presinápticas colinérgicas del sistema nervioso central y en neuronas peptidérgicas periféricas que inervan diversos tejidos. De los muchos pétidos neuroendocrinos con funciones inmunológicas, el VIP se distingue por su capacidad de afectar tanto a células B como a células

T directamente. Los distintos subconjuntos de células neuronales, respiratorias, gastrointestinales e inmunes llevan receptores de alta afinidad específicos de VIP, que están asociados con una proteína de unión al nucleótido guanina (G) capaz de activar la adenilato ciclasa. Libert et al., (1991) obtuvieron 4 nuevos receptores de la familia de receptores acoplados a la proteína G por amplificación selectiva y clonación de cDNA tiroide. Uno de ellos, RDC1, fue identificado como el receptor de VIP por Sreedharan et al (1991). Libert et al. (1991) mapearon el gen VIPR en 2q37 por hibridación in situ. Informaciones posteriores hicieron dudoso que el gen mapeado en 2q37 fuera de hecho el gen del receptor de VIP (Vassart, 1992). La secuencia que designó como GPRN1 Sreedharan et al. (1991) y que se mapeó en 2q37 se encontró que no se unía a VIP según Wenger (1993). Sreedharan et al. (1995) aislaron un gen del receptor de VIP de tipo I auténtico y lo localizaron por hibridación in situ con fluorescencia en la banda de 3p22 en una región asociada al cáncer de pulmón de células pequeñas. Por análisis de retrocruzamiento interespecífico, Hashimoto et al. (1999) mapearon el gen Vipr1 de ratón en la región distal del cromosoma 9, una región que muestra

2342

homología de sintenia con el cromosoma humano 3p. Sreedharan.et al. (1993) clonaron un gen del receptor de VIP intestinal humano, la secuencia de aminoácidos deducida comparte el 84% de identidad con el receptor de VIP de pulmón de rata. Couvineau et al. (1994) aislaron 2 clones de cDNA de VIPR a partir de una biblioteca de cDNA de célula epitelial de yeyuno humano. Uno codifica un receptor de VIP que consiste en 460 aminoácidos y que tiene 7 dominios transmembrana putativos, así como otros receptores acoplados a la proteína G. El otro codifica una proteína relacionada con el receptor de VIP de 495 aminoácidos que exhibe un 100% de homología con el receptor de VIP funcional a lo largo de 428 aminoácidos y en la región C-terminal, pero que contiene un dominio N-terminal completamente divergente de 67 aminoácidos. Cuando se expresa en células COS-7, la segunda proteína no se une a VIP radioyodado, aunque se dirigió normalmente a la membrana plasmática como se evaluó por estudios de inmunofluorescencia. Sreedharan et al. (1995) encontraron que el receptor de VIP de tipo I, también denominado receptor PACAP de tipo II (véase 102981 para otro tipo de receptor PACAP), abarcaba aproximadamente 22 kb y comprendía 13 exones (entre

42 y 1.400 pb) y 12 intrones (entre 0,3 y 6,1 kb). Sreedharan et al. (1995) caracterizaron también le promotor y la región adyacente del extremo 5' del gen".

Como se ha indicado, las explicaciones de los antecedentes sobre el VIP y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al (ibidem). El siguiente texto referente a VIPR2 o VPAC2 se ha extraido de esa fuente.

"El péptido intestinal vasoactivo (VIP, 192320) y el polipéptido activante de la adenilato ciclasa en pituitaria (PACAP, 102980) son péptidos homólogos que funcionan como neurotransmisores y como hormonas neuroendocrinas. Aunque los receptores de VIP y PACAP comparten homología, difieren en sus especificidades de sustrato y en sus patrones de expresión. Veáse VPR1 (192321) y ADCYAP1R1 (102981). Svoboda et al. (1994) realizaron una PCR de bajo rigor utilizando cebadores basados en secuencias conservadas entre los receptores de VIP. Clonaron el gen del receptor de VIP2 humano de una biblioteca de cDNA de linfoblasto. Este gen codificaba un polipéptido de 438 aminoácidos que comparte el 86% de identidad con el receptor de VIP2 de rata. Expresaron el receptor de VIP2 humano en células de ovario de hámster chino y encontraron que se une a PACAP-38, PACAP-27, VIP y helodermina, y esa unión del receptor a cualquiera de estos péptidos activa la adenilato ciclasa. Se encontró que la unión de los péptidos estaba inhibida por GTP. Adamou et al. (1995) clonaron el gen del receptor de VIP2 de una biblioteca de cDNA de placenta humana. La transferencia Northern reveló que VIPR2 se expresaba como 2 transcriptos de 4,6 kb y 2,3 kb a altos niveles en el músculo esquelético y a niveles menores en corazón, cerebro, placenta y páncreas. Mackay et al. (1996) utilizaron hibridación in situ con fluorescencia para mapear el gen VIPR2. Posteriores mapeados con líneas celulares derivadas de pacientes con holoprosencefalia tipo 3 (HPE 3, 142945) revelaron que el gen VIPR2 se encuentra en la región crítica mínima HPE3. MacKay et al (1996) afirmaron que aunque VIPR2 puede contribuir al fenotipo de HPE3, no es el único factor responsable".

AC (adenilato ciclasa)

Según un aspecto de la presente invención, una diana adicional es una diana $P_{cAMP}$, siendo la diana $P_{cAMP}$ la AC.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de AC están disponibles en la bibliografía.

Para confirmar que el VIP induce la vasorrelajación a través de la elevación de los niveles de cAMP intracelular y la consiguiente activación de la adenilato ciclasa, se han medido las concentraciones de cAMP vaginal durante la estimulación con VIP y se ha utilizado forscolina, un activador de la adenilato ciclasa, para imitar los efectos de activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa.

En estos estudios, se encuentra que el tratamiento con VIP y forscolina eleva las concentraciones intracelulares de cAMP en tejido vaginal aislado.

También se encuentra que la forscolina aumenta el flujo sanguíneo vaginal en un modelo animal de excitación sexual.

Además encontramos que la forscolina induce la relajación en la vagina aislada.

Las explicaciones de los antecedentes sobre la AC y sus receptores asociados han sido preparadas por Victor A. McKusick et al en http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/-searchomim.htm. La siguiente información referente a la AC

2346

se ha extraído de esa fuente.

"La adenilato ciclasa (EC 4.6.1.1) cataliza la transformación de ATP en AMP cíclico. La actividad enzimática está bajo el control de varias hormonas, y diferentes polipéptidos participan en la transducción de la señal del receptor al resto catalítico. Los receptores estimuladores o inhibidores (Rs y Ri) interactúan con las proteínas G (Gs y Gi) que exhiben actividad GTPasa y modulan la actividad de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa. Parma et al. (1991) clonaron un cDNA correspondiente a adenililciclasa de cerebro humana, simbolizada por ellos como HBAC1. Por hibridación in situ a extensiones cromosómicas en metafase utilizando la sonda de cDNA de cerebro humano, Stengel et al. (1992) mostraron que el gen está localizado en 8q24.2. Se asignó un gen altamente homólogo, ADCY2 (103071) a 5p15.3 mediante el mismo procedimiento".

## TECNICAS DE METODOLOGIA GENERAL DE DNA RECOMBINANTE

Aunque en general las técnicas mencionadas en la presente son bien conocidas en la técnica, puede hacerse referencia en particular a Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) y a Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999), 4ª edición, John Wiley & Sons, Inc. Se describe la PCR en los documentos US-A-4683195, US-A-4800195 y US-A-4965188.

## SUMARIO

En resumen, la presente invención se refiere al uso de un I:PDE para tratar la FSD, en particular el FSAD.

## EJEMPLOS

La presente invención se describirá a continuación, sólo como ejemplos, en los que se hace referencia a las siguientes Figuras:

La Figura 1 que es un gráfico,
La Figura 2 que es un gráfico,
La Figura 3 que es un gráfico,
La Figura 4 que es un gráfico,
La Figura 5 que es un gráfico,
La Figura 6 que es un gráfico,
La Figura 7 que es un gráfico,
La Figura 8 que es un gráfico,

2348

La Figura 9 que es un gráfico,
La Figura 10 que es un gráfico,
La Figura 11 que es un gráfico, y
La Figura 12 que es un gráfico.

Se comprende que el agente de la presente invención es un I:NEP. Las explicaciones sobre I:PDE y I:NPY se presentan también porque indicarían claramente a un experto que el agente de la presente invención podría utilizarse en combinación con uno o ambos de estos tipos de agente para conseguir el efecto beneficioso mencionado en la presente. Estas explicaciones adicionales se incluyen también como apoyo adicional de los descubrimientos básicos de los presentes autores.

Se discutirán ahora las figuras más detalladamente:

Figura 1. Estimulación eléctrica del nervio pélvico que induce un aumento dependiente de la frecuencia del flujo sanguíneo vaginal en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Al aumentar la frecuencia de estimulación se inducen mayores aumentos del flujo sanguíneo. Se monitorizaron los cambios utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 2. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. La Figura 2A ilustra cómo aumenta el flujo sanguíneo vaginal de manera dependiente de la concentración por infusiones de VIP (bolo intravenoso). La Figura 2b demuestra que 2 infusiones repetidas de VIP producen aumentos similares del flujo sanguíneo. Obsérvese que la duración de la respuesta es también similar. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 3. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) reduce la presión sanguínea arterial media en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Este gráfico ilustra los efectos típicos de los agentes vasoactivos, y los parámetros de estimulación utilizados para investigar el flujo sanguíneo en la vagina, respecto a la presión arterial media en un conejo anestesiado. Estos efectos observados son típicos de las tendencias vistas en todos los animales ensayados. El VIP indujo una depresión significativa de la presión arterial media, mientras la estimulación del nervio pélvico, no teniendo efecto las infusiones de control de suero salino heparinizado o de inhibidores de $PDE_{cAMP}$ o NEP sobre la presión sanguínea. Obsérvese que la reducción de la presión sanguínea asociada

con las infusiones de VIP está también asociada a un gran aumento del ritmo cardiaco.

Figura 4. La activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa imita la vasorrelajación mediada por VIP y la relajación de músculo liso en tejido vaginal. La Figura 4a ilustra que una infusión de forscolina (un mimético de cAMP, 40 nmol/kg/bolo intravenoso) induce aumentos significativos del flujo sanguíneo vaginal. Obsérvese que la amplitud y duración de la respuesta es similar a la inducida por el VIP (20,0 µg/kg bolo intravenoso). Resulta interesante que los efectos sobre el flujo sanguíneo tienen una duración mayor de acción sobre la pared vaginal externa. Todos los cambios se monitorizaron utiliziando tecnologías de láser Doppler. La Figura 4b demuestra que tanto el VIP (0,1 µM) como la forscolina (10 µM) elevan significativamente las concentraciones intracelulares de cAMP por encima de los niveles basales en vagina de conejo. La Figura 4c muestra que la forscolina induce potentes relajaciones en bandas vaginales de conejo precontraídas (1 µM de fenilefrina) con un CI de aproximadamente 300 nM. Se cuantificaron todos los cambios utilizando tecnologías de láser Doppler in vivo, de enzimoinmunoensayo de cAMP bioquímico o de relajación de tejidos in vitro.

Figura 5. La infusión de VIP aumenta el flujo sanguíneo clitorídeo y la activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa imita la vasorrelajación clitorídea mediada por VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. La infusión de VIP (60-200 µg/kg) induce un aumento dependiente de la concentración del flujo sanguíneo clitorídeo. Se observó un aumento del 115% del flujo sanguíneo clitorídeo después de una infusión intravenosa de 200 µg/kg de VIP. Los efectos de VIP sobre el flujo sanguíneo clitorídeo pueden imitarse por una infusión del mimético de cAMP, forscolina (FSK, 40 nmol/kg bolo intravenoso). Se observó un aumento del 156% del flujo sanguíneo clitorídeo después de una infusión intravenosa de 40 nmol/kg de forscolina. Todos los aumentos fueron significativamente elevados respecto de las infusiones control (suero salino heparinizado). Obsérvese que la amplitud de la respuesta es similar a la inducida por VIP (200 µg/kg, bolo intravenoso) y comparable a las observadas en el flujo sanguíneo vaginal de las figuras 2 y 4. Se cuantificaron todos los cambios por tecnologías de láser Doppler in vivo y eran significativamente superiores comparados con las infusiones de vehículo (suero salino heparinizado).

Figura 6. Un inhibidor selectivo de NEP EC 3.4.24.11

estimula el aumento del flujo sanguíneo vaginal por estimulación del nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. PNS repetidas con intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (barra blanca). La administración de un inhibidor de NEP (barra gris) estimula el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4Hz), comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control o los controles de vehículo coincidentes en el tiempo (barra rayada). Se observaron los siguientes aumentos dependientes de la dosis: 0,3 mg/kg, iv, indujo un aumento del 40% y 1,0 mg/kg, iv, indujo un aumento del 91% (n media = 3). El inhibidor de NEP no tuvo efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (no estimulado) (datos no mostrados). Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 7. Los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 estimulan los aumentos de flujo sanguíneo vaginal inducidos por VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las infusiones de VIP repetidas en intervalos de 30 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b). El inhibidor de NEP potencia la amplitud y prolonga la duración del flujo

sanguíneo estimulado cuando estos aumentos estan inducidos por dosis submáximas de VIP, por ejemplo 6,0 µg/kg. A dosis de VIP que inducen aumentos máximos del flujo sanguíneo vaginal, por ejemplo 60 µg/kg, los inhibidore de NEP potencian sólo la duración del flujo sanguíneo vaginal. Se muestran los aumentos inducidos por VIP en presencia de un inhibidor de NEP como triángulos negros, mostrándose las respuestas de control VIP como triángulos blancos. La infusión de control de suero salino heparinizado no tiene efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando técnologías de láser Doppler.

Figura 8. Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal estimulados por el nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las PNS repetidas en intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (cuadrados blancos). La administración del inhibidor de $PDE_{cAMP}$ tipo 2 estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (cuadrados negros, a 4Hz) comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control coincidente en el tiempo (cuadrados blancos). Una infusión del inhibidor PDE2 (500

2354

μg/kg) indujo una estimulación de 86,8 ± 21,9% del flujo sanguíneo vaginal (media ± s.e.m. error típico de la media), n= 2). Todos los cambios se monitorizaron utilizando técnologías de láser Doppler.

Figura 9: Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal inducidos por VIP en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. Las infusiones de VIP repetidas en intervalos de 30 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b). Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 (25 μg/kg, bolo intravenoso) potencia la duración del flujo sanguíneo vaginal estimulado inducido por VIP (60 μg/kg, bolo intravenoso). Los aumentos inducidos por VIP en presencia de un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ se muestran como triángulos negros; mientras que las respuestas control de VIP se muestran como triángulos blancos. La infusión control de suero salino heparinizado no tuvo efecto sobre la amplitud de las respuestas. Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

Figura 10. Un antagonista selectivo de los receptores de NPY Y1 estimula los aumentos de flujo sanguíneo vaginal estimulados por el nervio pélvico (PNS) en el modelo en

conejo anestesiado de excitación sexual. Las PNS repetidas en intervalos de 15 minutos inducen aumentos reproducibles del flujo sanguíneo vaginal (datos no mostrados). La administración de un antagonista de NPY Y1 (barra gris) estimula el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal inducido por frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4Hz), comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control o los controles de vehículo coincidentes en el tiempo (barra rayada). Se observaron los siguientes aumentos dependientes de la dosis: 0,01 mg/kg, iv, indujo un aumento del 15,8 ± 19,6%, 0,03 mg/kg, iv, indujo un aumento del 35,1 ± 17,17%, 0,10 mg/kg indujo un aumento del 60,1 ± 16,9% y 0,3 mg/kg indujo un aumento del 91,1 ± 27,4% (media ± s.e.m. n = 3). El antagonista de NPY Y1 no tuvo efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (no estimulado) (datos no mostrados). Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

La Figura 11 proporciona un gráfico resumen para algunos de los datos proporcionados en la presente, que muestra que los agentes de la presente invención son muy útiles para aumentar el flujo sanguíneo vaginal por potenciación de los niveles de cAMP endógeno.

Figura 12. Un inhibidor selectivo de NEP EC 3.4.24.11

estimula los aumentos de flujo sanguíneo clitorídeo estimulados por el nervio pélvico (PNS) en el modelo en conejo anestesiado de excitación sexual. La administración de un inhibidor de NEP (barra gris) estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo clitorídeo inducido por frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4Hz), comparado con los aumentos observados durante las estimulaciones de control o los controles de vehículo coincidentes en el tiempo (barra rayada). Se observaron los siguientes aumentos dependientes de la dosis: aproximadamente 1,0 mg/kg, iv, indujo un aumento del 131% (media n = 3). El inhibidor NEP no tuvo efecto sobre el flujo sanguíneo clitorídeo basal (no estimulado). Todos los cambios se monitorizaron utilizando tecnologías de láser Doppler.

## UN ENSAYO PARA MEDIR LAS ACTIVIDADES/NIVELES DE cAMP

Medida de cAMP en muestras de tejidos vaginales utilizando un estuche de enzimoinmunoensayo (EIA) para cAMP de Biotrak (Amersham Life Sciences RPN 225).

Los niveles de cAMP se miden por EIA en muestras de tejido vaginal. El EIA se basa en la competición entre cAMP sin marcar y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa

2357

para una cantidad limitada de anticuerpo específico de cAMP.

## 1. MATERIALES

Todos los materiales son suministrados por el estuche EIA para cAMP de Amersham Life Sciences (RPN 225), a menos que se indique otra cosa.

1.1 Placa de microvaloración. Placa de 96 pocillos recubierta con IgG de asno anti-conejo.

1.2 Tampón de ensayo. Tampón acetato de sodio 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Los contenidos del frasco se transfieren a una probeta utilizando lavados de agua destilada, 3 x 15 ml. El volumen final se ajusta entonces a 500 ml.

1.3 Patrón de cAMP (para el procedimiento de acetilación). cAMP a 10,24 pmol/ml en tampón acetato 0,05, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Se disuelve el patrón en 2,5 ml de tampón de ensayo para su uso.

1.4 Antisuero. Anticuerpo anti-cAMP en tampón acetato 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras reconstituir. Antes de su uso, se

2358

diluye el anticuerpo con 11 ml de tampón de ensayo y se mezcla por inversión suave para disolver los contenidos.

1.5 Conjugado de cAMP. cAMP-peroxidasa de rábano picante en tampón acetato 0,05 M, pH 5,8 que contiene seroalbúmina bovina al 0,02% y conservante al 0,5% tras su reconstitución. Antes de su uso, se diluye la disolución con 11 ml de tampón de ensayo y se mezcla por inversión suave para disolver los contenidos.

1.6 Tampón de lavado. Tampón fosfato 0,01 M, pH 7,5, que contiene Tween™20 al 0,05% (v/v) tras reconstituir. Se transfieren los contenidos del frasco a una probeta utilizando lavados de agua destilada, 3 x 15 ml. El volumen final se ajusta a 500 ml.

1.7 Sustrato TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)/peróxido de hidrógeno en dimetilformamida al 20% (v/v).

Preparado para su uso.

1.8 Reactivo de acetilación. 2 ml de anhídrido acético, 4 ml de trietilamina, preparado según sea necesario.

1.9 Acido sulfúrico (1M). Se prepara ácido sulfúrico 1 M a partir de una disolución madre 18M (BDH).

Se añaden 1,11 ml a 18,8 ml de agua destilada.

## 2. EQUIPAMIENTO ESPECIFICO

2.1 Tubos de ensayo de vidrio de 5 ml desechables.
2.2 Lector espectrofotométrico de placas (Spectra max 190)
2.3 Agitador de placas de microvaloración (Luckham R100).

## 3. PROCEDIMIENTOS

- Preparación de muestras de tejido. Se trataron los tejidos con el pretratamiento relevante en muestras de 5 ml en disolución salina fisiológica de, por ejemplo, agonistas, miméticos de cAMP, etc. Después del tratamiento, las muestras se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y después se trituraron utilizando un martillo. Se rascó el polvo en un tubo de centrífuga y se añadió 1 ml de ácido perclórico (PCA) 0,5 M enfriado con hielo. Se agitó en Vortex la muestra, se mezcló y se dejó en hielo durante 1 hora.

- Extracción de cAMP de muestras de tejido. Se centrifugaron las muestras a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en otros tubos de centrífuga. Se conservó el sedimento para análisis de proteína a -80°C. Se neutralizaron después las muestras de sobrenadante a pH 6 utilizando $K_3PO_4$. Se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se lavó 4 veces con 5 volúmenes (5 ml) de éter dietílico saturado de agua. Se desechó la capa superior de éter después de cada lavado. Se transfirió la capa acuosa a un tubo corto de vidrio fino y se secó en atmósfera de nitrógeno a 60°C. Se disolvió el extracto seco en 1 ml de tampón de ensayo y se almacenó en nevera hasta que fue necesario (o también puede congelarse).

- Se equilibran las disoluciones madre de los reactivos a temperatura ambiente y se preparan las disoluciones de trabajo.

- Se preparan los patrones de cAMP en tubos de vidrio etiquetados como 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512 fmol. Esto se consigue añadiendo 1 ml de tampón de ensayo a todos los tubos excepto al de patrón de 512 fmol. Se añade entonces 1 ml de patrón de acetilación (10,24 pmol/ml) a los dos patrones superiores (256 y 512 fmol). Se agita en Vortex el patrón de 256 fmol y se transfiere 1 ml al patrón de 128 fmol. Esto se vuelve a llevar a cabo hasta el patrón de 2 fmol, en el que se dispone 1 ml de disolución. Se establece un tubo patrón cero que contiene 1 ml de tampón de ensayo.

- Se descongelan las muestras de extractos de tejidos en hielo (si es necesario) y se diluyen 1 a 100 (10 $\mu$l de muestra en 990 $\mu$l de tampón de ensayo) en tubos de vidrio etiquetados.

- Se acetila el cAMP en todos los patrones y muestras por adición de 100 $\mu$l de reactivo de acetilación, en

2361

campana de gases, que se añaden en un lado del tubo antes de la inmediata agitación en Vortex.

- Se añaden 50 µl de todos los patrones y muestras a los pocillos apropiados de la placa de 96 pocillos, y se añaden 150 µl de tampón de ensayo a los pocillos de unión no específica (NSB).
- Se añaden 100 µl de antisuero a todos los pocillos excepto los blancos (B) y a los NSB antes de incubar durante 2 horas a 3-5°C
- Después de la incubación, se añaden 100 µl de conjugado cAMP-peroxidasa a todos los pocillos excepto a los B antes de 1 hora más de incubación a 3-5°C.
- Se vacían las placas dándoles la vuelta y transfiriendo a un papel absorbente antes de lavar cada pocillo cuatro veces con 400 µl de tampón de lavado. Después de cada lavado se retransfieren las placas para asegurar que se extrae cualquier tampón de lavado residual. Se añaden inmediatamente después 200 µl de TMB a todos los pocillos.
- Se ponen las placas en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1 M en todos los pocillos. Se lee la densidad óptica en un dispositivo Spectra max 190 a 450 nm durante 30 minutos.

## 4. PATRONES

Se establecen con cada ensayo los siguientes tubos patrones:

### 4.1 Adición de un patrón en tampón de ensayo

Se añade una cantidad conocida de cAMP en tampón de ensayo para determinar la eficacia del ensayo. Se añaden 70 pmol/ml de cAMP al tampón de ensayo, que es equivalente a 35 fmol/pocillo en el ensayo, que está en la mitad de la curva de respuesta a la dosis.

Para preparar 1 ml de patrón: 68,4 µl de patrón 521 fmol/pocillo en 931,6 µl de tampón de ensayo

### 4. Efectos de los compuestos sobre la placa

Se establecen los patrones para determinar si el compuesto utilizado en los estudios funcionales tiene algún efecto sobre la placa de 96 pocillos o si afecta a la unión de cAMP. Estos incluyen:

- Adición del compuesto en tampón de ensayo por separado para evaluar los efectos del compuesto directamente sobre la placa.

- Adición del compuesto en plasma que contiene niveles basales de cAMP para evaluar los efectos del compuesto sobre la unión de cAMP a la placa.

Se añaden concentraciones 5 nM de compuesto a cada patrón. Se elige 5 nM porque los niveles de medicamento total al final de la infusión han sido en el pasado de aproximadamente 150-300 nM. Se diluyen las muestras 1:100 antes de ensayar, por lo tanto 5 nM permite concentraciones de medicamento mayores de las esperadas al final de la infusión.

## 5. CALCULOS

El lector de placas Spectra max lee la densidad óptica (DO) a 450 nm.

La curva patrón se genera por representación del $\%B/B_0$ (eje y) frente a fmol/pocillo de cAMP (eje x) en Spectra max.

$\%B/B_0$ (% unido) para cada muestra y patrón se calcula como sigue:

$B_0$ = patrón cero (véase el procedimiento 3.2).

$\%B/B_0 = \underline{(\text{DO de patrón o muestra-DO de NSB})} \times 100$

(DO de $B_0$ - DO de NSB)

El volumen fmol/pocillo puede leerse entonces directamente en la curva patrón para cada muestra. Entonces se convierten los valores en pmol/ml antes de tomar la media de cada par de muestras.

Conversión de valores de fmol/pocillo a pmol/ml:

fmol a pmol = dividir entre 1000
volumen en pocillo = 50 µl ... (x1000)
50
La muestra se diluye 1/100, así que en conjunto = 1 x 1000/1000 x 100/50 = 2

Así que todos los valores de fmol/pocillo se multiplican por 2 para dar pmol/ml.

## MODELO DE ENSAYO ANIMAL

### LA POTENCIACION DE LOS EFECTOS DEL 3'-5'-MONOFOSFATO DE ADENOSINA CICLICO (cCAMP) DA COMO RESULTADO AUMENTOS DEL FLUJO SANGUINEO VAGINAL EN EL MODELO EN CONEJO ANESTESIADO DE EXCITACION SEXUAL.

2365

## 1.0 Objetivos

1. Desarrollar y validar un modelo animal de excitación sexual femenina.
2. Identificar el (los) mecanismo(s) responsable(s) de la regulación del flujo sanguíneo genital en conejo anestesiado.
3. Identificar los enfoques potenciales para la estimulación del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo.
4. Investigar el(los) mecanismo(s) que subyacen en la relajación del músculo liso vaginal e identificar los enfoques potenciales para la estimulación de la relajación vaginal.

## 2.0 Introducción

La respuesta de excitación sexual normal consiste en una serie de respuestas fisiológicas que se observan durante la excitación sexual. Estos cambios, como congestión vaginal, labial y clitorídea son el resultado de aumentos en el flujo sanguíneo genital. La congestión conduce a un aumento de la lubricación a través de la trasudación de plasma, aumento de la flexibilidad vaginal (relajación del músculo liso vaginal) y aumento de la sensibilidad vaginal

2366

y clitorídea.

El trastorno de la excitación sexual femenina (FSAD) es un trastorno sexual altamente prevalente que afecta a mujeres pre, peri y postmenopáusicas (±HRT). La consecuencia primaria del FSAD es la falta de congestión o tumefacción, que se manifiesta como falta de lubricación vaginal y falta de sensación genital placentera. Las consecuencias secundarias incluyen una reducción del deseo sexual, dolor durante el coito y dificultades para conseguir un orgasmo. La causa más común de FSAD es una reducción del flujo sanguíneo genital que se traduce en una reducción de la congestión vaginal, labial y clitorídea. (Park 1997, Goldstein 1998, Berman 1999a, Werbin 1999).

Como se ha explicado en la presente, la presente invención proporciona un medio para restablecer o potenciar la respuesta de excitación sexual normal en mujeres que sufren FSAD, estimulando el flujo sanguíneo genital.

En los estudios de los presentes autores se ha identificado el cAMP (3',5'-monofosfato de adenosina cíclico) como un mediador de la vasorrelajación vaginal utilizando tecnología de láser Doppler para medir pequeños cambios en el flujo sanguíneo genital. Utilizando un inhibidor del metabolismo de VIP (un inhibidor NEP EC 3.4.24.11), se ha demostrado también que los aumentos del flujo sanguíneo genital observados durante la estimulación del nervio pélvico (es decir la excitación sexual) están mediados por VIP. Esto ha implicado desarrollar un modelo animal de excitación sexual y demostrar que los datos reflejan los cambios fisiológicos observados durante la excitación sexual femenina. El modelo se ha utilizado entonces para identificar y validar mecanismos que estimulan el flujo sanguíneo genital, por ejemplo por potenciación directa o indirecta de la vasorrelajación mediada por cAMP.

## 3.0 Procedimientos

### 3.1 *Protocolo anestésico*

Se premedicaron conejos hembra de Nueva Zelanda (de aproximadamente 2,5 kg) con una combinación de medetomidina (Dormitor$^{(R)}$) 0,5 ml/kg intramuscular, y ketamina (Vetalar$^{(R)}$) 0,25 ml/kg intramuscular manteniendo la toma de oxígeno con una mascarilla facial. Se traqueotomizaron los conejos utilizando un tubo endotraqueal sin boquilla Portex™ 3ID conectado a un ventilador y se mantuvieron a una tasa de ventilación de 30-40 respiraciones por minuto, con un

2368

volumen de flujo periódico aproximado de 18-20 ml y una presión máxima en las vías aéreas de 10 cm de $H_2O$. Se cambió entonces la anestesia a isoflurano y siguió la ventilación con $O_2$ a 2 l/min. Se canuló la vena marginal de la oreja derecha utilizando un catéter 23G o 24G y se perfundió una disolución Ringer con lactato a 0,5 ml/min. Se mantuvo el conejo con isoflurano al 3% durante la cirugía invasiva, bajando a 2% para la anestesia de mantenimiento.

### 3.2 *Canulación de vasos*

Se afeitó el área de la ingle izquierda del conejo y se realizó una incisión vertical de aproximadamente 5 cm de longitud a lo largo del muslo. Se expusieron la vena y la arteria femorales, se aislaron y se canularon con un catéter de PVC (17G) para la infusión de medicamentos y compuestos. Se repitió la canulación para la arteria femoral, insertando el catéter a una profundidad de 10 cm para asegurar que el catéter alcanzaba la aorta abdominal. Se unió el catéter arterial a un sistema Gould para registrar la presión sanguínea. Se tomaron muestras para análisis de gases en sangre a través del catéter arterial. Se midieron las presiones sistólica y diastólica y se calculó la presión arterial media utilizando la fórmula (diastólica x 2 + sistólica) : 3. Se midió el ritmo cardiaco mediante un oxímetro de pulsos y el sistema de software de adquisición de datos Po-ne-mah (Ponemah Physiology, Gould Instrument Systemas Inc.).

### 3.3 *Estimulación del nervio pélvico*

Se realizó una incisión ventral de línea media en la cavidad abdominal. La incisión fue de unos 5 cm de longitud justo por encima del pubis. La grasa y el músculo se apartaron directamente para descubrir el nervio hipogástrico que recorre la cavidad corporal. Era esencial mantenerse cerca del lado curvo de la pared del pubis para evitar dañar la vena y arteria femorales que se encuentran por encima del pubis. Los nervios ciático y pélvico se encuentran más profundos y fueron localizados después de una dirección adicional del lado dorsal del conejo. Una vez se identificó el nervio ciático, se localizó fácilmente el nervio pélvico. El término nervio pélvico se aplica aproximadamente, los libros de anatomía sobre el tema no consiguen identificar los nervios con suficiente detalle. Sin embargo, la estimulación del nervio produce un aumento del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo, y la inervación de la región pélvica. El nervio pélvico se liberó del tejido circundante y se colocó un electrodo estimulante

Harvard dipolar alrededor del mismo. Se levantó ligeramente el nervio para proporcionar algo de tensión, después se aseguró el electrodo en la posición. Se colocó aproximadamente 1 ml de aceite de parafina ligera alrededor del nervio y el electrodo. Esto actúa como lubricante protector para el nervio y evita la contaminación de la sangre con el electrodo. Se conectó el electrodo a un estimulador Grass S88. Se estimuló el nervio pélvico utilizando los siguientes parámetros: 5V, anchura del pulso 0,5 ms, duración del estímulo 10 segundos e intervalo de frecuencia de 2 a 16 Hz. Se obtuvieron respuestas reproducibles cuando se estimuló el nervio cada 15-20 minutos.

Se determinó una curva de respuesta a la frecuencia al inicio de cada experimento para determinar la frecuencia óptima para usar como respuesta submáxima, normalmente 4 Hz. El(los) compuesto(s) a ensayar se infundieron, a través de la vena femoral, utilizando una bomba de infusión Harvard 22, permitiendo un ciclo de estimulación continuo de 15 minutos.

### 3.4 *Colocación de las sondas de láser Doppler*

Se realizó una incisión ventral de línea media en el extremo caudal del pubis para exponer el área púbica. Se eliminó el tejido conectivo para exponer la túnica del clítoris, asegurando que la pared estaba libre de pequeños vasos sanguíneos. Se expuso también la pared vaginal externa por eliminación del tejido conectivo. Se insertó una sonda de flujo de láser Doppler 3 cm en la vagina, de modo que el eje de la sonda siguiera visible. Se posicionó una segunda sonda de modo que se encontrara justo por encima de la pared externa clitorídea. Se ajustó entonces la posición de estas sondas hasta obtener una señal. Se colocó una segunda sonda justo por encima de la superficie de un vaso sanguíneo de la pared vaginal externa. Ambas sondas se fijaron en sus posiciones.

Se registraron el flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo directamente como números a partir del medidor de flujo, utilizando el software de adquisición de datos Po-ne-mah (Ponemah Physiology Platform, Gould Instrument System Inc.), o indirectamente a partir de la señal del registro gráfico Gould. Se fijó la calibración al inicio del experimento (0-125 ml/min/100 g tejido).

### 3.5 *Infusión de péptido intestinal vasoactivo (VIP)*

Las dosis de VIP (Bachem, H-3775) infundidas fueron 2,0, B372

6,0, 20,0, 60,0 μg/kg intravenosas y se infundieron en un volumen de 0,5 ml de suero salino. El VIP se infundió utilizando una bomba Harvard 22, infundiendo a 500 μl/min a través de una llave de tres vías en la vena femoral. Después de la infusión de VIP, se lavó el catéter con suero salino heparinizado (Suero salino heparinizado) de modo que no quedara VIP en el catéter.

Para experimentos que utilizan infusiones de VIP, existía la necesidad de una curva de respuesta a la dosis de sensibilización inicial (2-60 μg/kg), para poder obtener respuestas reproducibles. Se infundió una infusión inicial de Suero salino heparinizado (50 UI/ml) que actuara como control negativo.

### 3.6 *Infusión de inhibidores*

Se prepararon inhibidores de NEP (endopeptidasa neutra EC3.4.24.11), inhibidores de fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE5) y antagonistas de NPY Y1 en suero salino o disolución de glucosa al 5% (200 μl de glucosa al 50% en 1,8 ml de agua para inyecciones). Los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ se disolvieron en una disolución de etanol al 40% (200 μl de glucosa al 50% en 1,8 ml de agua/etanol para inyecciones). Se infundieron los inhibidores y los

2393

controles de vehículo a la misma velocidad que el VIP. Los inhibidores de NEP se dejaron durante 30 minutos antes de la curva de respuesta a la dosis de VIP, mientras que los inhibidores de NEP, los antagonistas del receptor de NPT Y1 y los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ se dejaron durante 15 minutos antes de la estimulación del nervio pélvico.

### 3.7 *Medida de la relajación del músculo liso en vagina de conejo aislada*

3.7 (a). Preparación de vagina de conejo in vitro: Se sacrificaron conejos blancos hembras de Nueva Zelanda (2,0-3,0 kg) por dislocación cervical. Se abrió la cavidad abdominal y se extrajo la vagina. Se montaron longitudinalmente bandas de tejido en cámaras de órganos silanizadas de 5 ml de Wesley Co. con suturas de seda trenzada (calibre 6/0) a una tensión en reposo inicial de 1,5 g en tampón bicarbonato de Krebs mantenido a 37°C y gasificado con 95% $O_2$/5% $CO_2$. Se unió la ligadura superior de cada banda de tejido a un transductor de desplazamiento de fuerza de 10 g de capacidad y se midieron y registraron los cambios en la fuerza isométrica utilizando un sistema de captura de datos in vitro DART. Se dejaron equilibrar los tejidos durante 1,5 horas y se lavaron regularmente con Krebs.

3.7 (b). Relajación inducida por el péptido intestinal vasoactivo en vagina de conejo: Se contrajo cada tejido utilizando una concentración de baño 1 µM de fenilefrina. Cuando la respuesta contráctil alcanzó una meseta estable (aproximadamente 15 minutos), se añadió acumulativamente VIP a la cámara de órganos en unidades logarítmicas para producir concentraciones de 0,1 a 100 nM. Se midieron las respuestas de relajación 5 minutos después de la adición de cada concentración de VIP, consiguiéndose la máxima relajación en ese momento. Después los tejidos recibieron un agente de ensayo (por ejemplo inhibidor de NEP o de PDE) o el vehículo DMSO (control coincidente en el tiempo).

3.7 (c). Análisis de datos para experimentos de relajación por VIP: Para cada curva de respuesta concentración de VIP-relajación, se expresaron las respuestas de relajación inducidas por VIP como un porcentaje de la contracción máxima inducida por fenilefrina. Estos valores se representaron entonces frente al logaritmo de la concentración de VIP y se ajustaron a curvas sigmoideas. Con fines de ajuste de curvas, se limitó la respuesta de relajación mínima al 0% y se dejó ajustar libremente la máxima respuesta de relajación. Se determinó la concentración de VIP requerida para producir una relajación del 50% de la contracción de fenilefrina ($CE_{50\,PE}$).

3.7 (d). Relajación estimulada por campo eléctrico de vagina de conejo: Se prepararon las bandas vaginales de conejo como se ha descrito en la sección 3.7 (a). Se montaron las bandas de tejido entre dos electrodos de platino situados en la parte superior e inferior de la cámara de órganos, separados unos 4 cm. Cada tejido se contrajo utilizando una concentración de baño 1 μM de fenilefrina. Cuando la respuesta contráctil alcanzó una meseta estable (15 minutos), los tejidos experimentaron un pretratamiento de curva de relajación inducida estimulada por campo eléctrico (EFS). Este se realizó a entre 40 y 60 voltios utilizando frecuencias secuenciales de 2, 4, 8 y 16 Hz suministradas como series de 10 segundos con anchura de pulso de 0,5 ms. Se dejaron volver los tejidos a la línea base de tensión precontráctil entre cada frecuencia (5 minutos) y se registró la extensión de la respuesta de relajación.

Después de terminar el pretratamiento de curva de respuesta inducida por EFS, se lavaron todos los tejidos durante 15 minutos, dejando a los tejidos volver a la tensión de línea base. Entonces los tejidos recibieron un agente de ensayo (por ejemplo un inhibidor de NEP o de PDE, un inhibidor de óxido nítrico sintasa (NOS)) o vehículo DMSO (control coincidente en el tiempo). Se recontrajeron los tejidos con fenilefrina (1 µM) 15 minutos después de la adición del compuesto o del vehículo y se determinó una curva de respuesta de relajación inducida por EFS como se ha descrito anteriormente.

Para los experimentos EFS, se complementó el medio Krebs con atropina (10 µM) y guanetidina (150 µM) para eliminar cualquier inervación colinérgica o adrenérgica de la vagina.

### 3.8 *Medida de los niveles de cAMP en vagina de conejo aislada*

Se realizó la medida de las concentraciones de cAMP a partir de extractos de tejido vaginal utilizando un estuche de enximoinmunoensayo (EIA) de cAMP Biotrak (Amersham Life Sciences, RPN 225). Se trataron las muestras de tejido vaginal aislado con agentes de ensayo (por ejemplo forscolina o VIP). Después de 5 minutos, se congelaron inmediatamente las muestras utilizando nitrógeno líquido, se homogeneizaron y se extrajo el cAMP. Se miden los niveles de cAMP por EIA. El EIA está basado en la competición entre el cAMP sin marcar y una cantidad fija de cAMP marcado con peroxidasa para una cantidad limitada de anticuerpo específico de cAMP.

### 3.9 *Medida de la actividad fosfodiesterasa (PDE) en vagina de conejo aislada*

Se obtuvieron extractos de citosol de pared vaginal humana de ABS Inc., Delaware (edad de las donantes de 41 a 60 años). Se separaron las isoenzimas PDE por cromatografía de intercambio aniónico Mono-Q y se caracterizaron basándose en su selectividad de sustrato, en su sensibilidad a moduladores alostéricos y en sus inhibidores selectivos. También se realizaron análisis Western utilizando anticuerpos de isoenzimas específicas de PDE para detectar la expresión de PDE en la vagina humana.

Todos los datos se comunican como media ± s.e.m. Los cambios significativos se identificaron utilizando ensayos de t de Student.

## 4.0 Resultados y Discusión

### 4.1 *Modelo animal de excitación sexual*

En los estudios, de los presentes autores se ha desarrollado un modelo reproducible y robusto de la fisiología de la excitación sexual. Utilizando este modelo en conejo anestesiado, son capaces de medir pequeños

2378

cambios del flujo sanguíneo genital utilizando tecnología de láser Doppler. La estimulación del nervio pélvico se utiliza para simular los efectos neuronales de la excitación sexual.

Se ha encontrado que la estimulación del nervio pélvico inducía aumentos dependientes de la frecuencia del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo (véase la figura 1). Los aumentos del flujo sanguíneo vaginal son significativos cuando se registran en la pared intra o extravaginal. La estimulación del nervio pélvico a 2Hz indujo una elevación media del flujo sanguíneo vaginal máximo de 10,3 ± 1,8, a 4 Hz 20,0 ± 4,6, a 8 Hz 36,3 ± 4,8 y a 16 Hz 46,6 ± 4,7 ml/min/100 g de tejido (n= 4), 15-20 V, 0,5 ms, 10 s) y aumentos del flujo sanguíneo clitorídeo de 14,7 ± 3,6 a 2 Hz, 29,4 ± 1,4 a 4 Hz y 69,7 ± 2,1 a 8 Hz. Estos valores son de amplitud similar a los observados anteriormente en estudios humanos y en modelos animales de excitación (Berman 1999a, Park 1997).

Se ha encontrado que la estimulación submáxima del nervio pélvico da como resultado aumentos reproducibles del flujo sanguíneo genital (por ejemplo la estimulación con 4 Hz cada 15 minutos proporcionó un aumento medio del flujo sanguíneo vaginal de 8,50 ± 0,10 ml/min/100 g de tejido, n= 8 y un aumento medio del flujo sanguíneo clitorídeo de 13,65 ± 0,86 ml/min/100 g de tejido, n= 11). Esta reproducibilidad se mantiene durante hasta 5 horas. Podemos utilizar la reproducibilidad de estas respuestas para investigar a) la identidad de los agentes/mecanismos vasoactivos endógenos que median la congestión genital y b) la influencia de los medicamentos que pueden ser eficaces en la estimulación del flujo sanguíneo vaginal y/o clitorídeo

Encontramos que no hay efectos cardiovasculares adversos asociados a la estimulación del nervio pélvico en el conejo anestesiado (véase la figura 3).

El flujo sanguíneo genital aumenta durante la excitación sexual (Berman, 1999) a través de un aumento del suministro de sangre arterial (la arteria vaginal, la rama vaginal de la arteria uterina, la arteria genital interna y las ramas medias de la arteria media rectal están todas implicadas en el suministro de sangre a la vagina y el clítoris). El nervio pélvico, que tiene su origen en las regiones espinales S2/S4, inerva los genitales femeninos y tiene ramas que terminan en la vagina inferior, el clítoris y los vasos sanguíneos relacionados. Mediante la estimulación del nervio pélvico, se puede simular los efectos sobre el flujo

2380

sanguíneo observados durante la excitación sexual, es decir, un aumento del flujo sanguíneo genital arterial. De forma interesante, el aumento de flujo sanguíneo arterial no se ve reflejado en un vaciado venoso que permita a las redes capilares congestionarse con la sangre. La congestión vaginal conduce a la lubricación vaginal a través de trasudación de plasma y esta es una de las primeras respuestas pélvicas observadas durante la estimulación sexual. Los neurotransmisores que se liberan con la estimulación del nervio pélvico o durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. Los nervios que contienen los neuropéptidos y otros candidatos a neurotransmisores que inervan la vasculatura y microvasculatura de la vagina y del clítoris, han sido identificados inmunohistoquímicamente. Estos estudios indican que el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), el neuropéptido Y (NPY), la óxido nítrico sintasa (NOS), la sustancia P y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) están todos presentes en los nervios que inervan la vagina y el clítoris humanos. (Hoyle, 1996, Burnett, 1997, Hauser-Kronberger, 1999).

### 4.2 *Validación del modelo de conejo anestesiado de excitación sexual*

Para traducir los datos de flujo sanguíneo generados utilizando este modelo a los observados en un modelo humano de excitación sexual, se compara directamente los datos de los presentes autores con datos de flujo sanguíneo vaginal y cardiovascular generados en estudios preclínicos.

Se ha encontrado que la infusión de VIP tiene los siguientes efectos en el modelo en conejo de excitación sexual:

- El VIP exógeno (bolo intravenoso) induce aumentos dependientes de la concentración significativos del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2a). Estos aumentos son significativamente elevados por encima de los valores de flujo sanguíneo basal cuando se registran en la pared intra- o extravaginal. El flujo sanguíneo vaginal aumentó significaticamente en 24,7 ± 3,6 ml/min/100 g de tejido con una administración intravenosa de VIP (60 μg/kg). El flujo sanguíneo permaneció elevado por encima del basal durante aproximadamente 11 minutos después de la infusión. Dosis menores indujeron aumentos menores, por ejemplo 6,0 μg/kg elevaron el flujo sanguíneo en 7,5 ± 1,3 ml/min/100 g de tejido y el flujo sanguíneo se elevó durante 7 minutos después de la infusión.

- Las infusiones repetidas de dosis similares de VIP (intravenoso en intervalos de 30 minutos) inducen aumentos reproducibles significativos en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 2b).

- El VIP (intravenoso) aumenta significativamente el ritmo cardiaco y reduce la presión sanguínea arterial media (véase la figura 3). A 6,0 μg/kg de VIP (intravenoso) se produjo una reducción significativa de la presión sanguínea arterial media de 13,2 ± 0,7 mm Hg y un aumento significativo del ritmo cardiaco de 16 ± 4 latidos por minuto.

Este modelo animal refleja directamente los datos clínicos observados por infusión de VIP en voluntarias sanas, es decir, aumento del flujo sanguíneo vaginal, una presión sanguínea deprimida y un ritmo cardiaco elevado. Por lo tanto, este modelo puede utilizarse para investigar el (los) mecanismo(s) que subyace(n) a los cambios fisiológicos que aparecen durante la excitación sexual y para validar además los nuevos enfoques de la estimulación del flujo sanguíneo vaginal y por ello del tratamiento de FSAD.

### 4.3 *Cambios inducidos por el VIP en el flujo sanguíneo*

2383

*vaginal mediante la estimulación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa*

Ottesen y colaboradores demostraron que el VIP induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal y en la lubricación en voluntarias sanas. Sin embargo, el mecanismo por el que el VIP ejerce este efecto no está claro. En la bibliografía hay muchos ejemplos de señalización de VIP mediante diferentes segundos mensajeros, incluyendo cGMP/guanilato ciclasa (Ashur-Fabian, 1999), monóxido de carbono/hemo oxigenasa (Fan, 1998) y cAMP/adenilato ciclasa (Schoeffer, 1985, Gu, 1992, Foda, 1995). Esto se ejemplifica por un reciente artículo que describe cómo los efectos relajantes de VIP en la arteria uterina pueden explicarse por la liberación de óxido nítrico (Jovanovic, 1998). De forma interesante, existen también evidencias de que NO/cGMP modula el VIP en la función urogenital masculina (Kim, 1994) y existen evidencias directas de que el tratamiento de cultivos celulares de músculos lisos vaginales humanos con VIP (0,5 $\mu$M) no consigue elevar los niveles de cAMP (Traish, 1999, ibidem).

En este estudio los presentes autores han mostrado que el VIP induce la vasorrelajación mediante la elevación de los niveles de cAMP intracelular. Realizando una serie de experimentos funcionales se ha medido el flujo sanguíneo y la relajación del músculo liso además de medir bioquímicamente las concentraciones de cAMP intracelular. Se ha utilizado forscolina, un activador de adenilato ciclasa, o un mimético de cAMP, para imitar los efectos de la activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa. El VIP y la forscolina tienen efectos idénticos sobre los efectos fisiológicos de la excitación sobre el flujo sanguíneo vaginal y la relajación.

El VIP (20 μg/kg) y la forscolina (40 nmol/kg) inducen aumentos significativos del flujo sanguíneo vaginal, 13,2 y 12,7 ml/min/100 mg de tejido respectivamente (véase las figuras 2a y 4a). Estos cambios en la amplitud inducida por VIP y forscolina no eran significativamente diferentes. Estos aumentos son significativamente elevados por encima de los valores de flujo sanguíneo basal registrados en la pared intra o extravaginal.

El VIP (0,1 μM) y la forscolina (10 μM) aumentaron ambos significativamente las concentraciones intracelulares de cAMP por encima de los niveles basales en tejido vaginal aislado (véase la figura 4b).

El VIP (0,1 μM) y la forscolina (10 μM) elevan las

2385

concentraciones basales de 276 nM en un 156% y un 238%, respectivamente. Las diferencias en estos porcentajes reflejan la diferencia de concentraciones de VIP y forscolina utilizados, por ejemplo el VIP a una concentración de 0,1 μM relaja la vagina aislada precontraída en aproximadamente un 80%, mientras que la forscolina 10 μM es suficiente para relajar completamente el tejido aislado.

Además, los presentes autores muestran que el VIP y forscolina inducen la relajación en tejido vaginal aislado con valores de $CE_{50}$ de 18,8 ± 0,6 nM y 320 ± 20 nM respectivamente (véase la figura 4c).

Estos datos establecen que el VIP induce la vasorrelajación vaginal a través de la ruta cAMP/adenilato ciclasa, por ello este modelo puede utilizarse para investigar si la estimulación del nervio pélvico, es decir la excitación sexual, conduce a la liberación de VIP/activación de la ruta cAMP/adenilato ciclasa. Además, pueden investigarse los enfoques para estimular el flujo sanguíneo vaginal durante la excitación sexual, por ejemplo estimulando directa o indirectamente la señalización de cAMP.

### 4.4 *cAMP es el mediador de la vasorrelajación vaginal*

2386

Los candidatos a neurotransmisor y segundo mensajero responsables de los aumentos del flujo sanguíneo vaginal durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. Hasta la fecha, los investigadores se han centrado en la ruta del óxido nítrico (NO)/cGMP. Según la presente invención, se ha demostrado que: 1) la ruta cAMP/adenilato ciclasa media los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal. 2) el VIP es un neurotransmisor endógeno liberado durante la excitación sexual y 3) el VIP liberado endógenamente induce efectos vasorrelajantes mediante la elevación de los niveles de cAMP.

El neurotransmisor responsable de la relajación de la pared vaginal está actualmente sin identificar. Los presentes autores han mostrado que el VIP es el neurotransmisor que se libera por estimulación del nervio pélvico y que cAMP media la vasorrelajación mediada por VIP. Los agentes que evitan el metabolismo de VIP o que estimulan directamente la señalización de cAMP, potencian los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal, por ejemplo inhibidores de NEP o inhibidores de $PDE_{cAMP}$, respectivamente (véanse las siguientes secciones).

En los estudios de los presentes autores se ha encontrado que se puede excluir el papel del NO en la relajación vaginal inducida por VIP. Un potente y selectivo inhibidor de PDE de tipo 5 tiene un efecto mínimo sobre la relajación inducida por VIP de músculo liso vaginal aislado (estimulaciones del 30% de relajaciones inducidas por VIP, véase la tabla 1).

Tabla 1: Estimulación de la relajación mediada por VIP de vagina de conejo aislada. Esta tabla ilustra el porcentaje de estimulación de la $CE_{50}$ para relajaciones mediadas por VIP de músculo liso vaginal precontraído (fenilefrina 1 $\mu$M ). Los inhibidores selectivos de $PDE_{cAMP}$ de tipos 1, 2, 3 y 4 potenciaron todos significativamente las relajaciones mediadas por VIP, mientras que un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 5 o un control de vehículo no tuvieron efecto sobre las relajaciones mediadas por VIP.

| Inhibidor de PDE a dosis selectiva | Porcentaje de estimulación de la relajación inducida por VIP |
|---|---|
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 1 | 210% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 | 130% |
| $PDE_{cAMP}$ de tipo 3 | 220% |

| | |
|---|---|
| PDE$_{cAMP}$ de tipo 4 | 160% |
| PDE$_{cAMP}$ de tipo 5 | Sin efecto (30%) |
| Control de vehículo | Sin efecto |

Los presentes autores han mostrado que el VIP es también el neurotransmisor endógeno NANC (no adrenérgico, no colinérgico) parcialmente responsable de las relajaciones inducidas por EFS de músculo liso vaginal aislado. Una dosis elevada de inhibidor de óxido nítrico sintasa (L-NOARG, 300 $\mu$M) inhibe sólo el 50% de las relajaciones inducidas por EFS. Un inhibidor de NEP (1 $\mu$M) que evitará el metabolismo de VIP inducido por NEP, y que por lo tanto estimula la señalización de VIP, estimula la relajación NANC, que no depende de óxido nítrico, inducida por EFS. Han mostrado que tanto NO como VIP regulan el tono del músculo liso en la pared vaginal. Terapéuticamente será posible estimular las relajaciones del músculo liso vaginal con agentes que estimulan la señalización mediada por NO/cGMP y/o VIP/cAMP.

### 4.5 *VIP induce la vasorrelajación clitorídea mediante la ruta del cAMP*

Los candidatos a neurotransmisor y segundo mensajero responsables del aumento de flujo sanguíneo clitorídeo durante la excitación sexual están actualmente sin identificar. En consonancia con la investigación actual sobre flujo sanguíneo vaginal, los trabajos han especulado y se han centrado en la ruta del óxido nítrico (NO)/cGMP. No hay informes de que el VIP juegue un papel en la mediación del flujo sanguíneo clitorídeo/congestión aunque se han visualizado neuronas que contienen VIP en tejido clitorídeo (Hauser-Kronberger et al, 1999).

En este estudio los presentes autores demuestran que:

1. La infusión de VIP aumenta el flujo sanguíneo clitorídeo.

2. La ruta de cAMP/adenilato ciclasa media los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo clitorídeo.

3. El VIP es un neurotransmisor clitorídeo endógeno que se libera durante la excitación sexual:

1. La infusión de VIP (60-200 μg/kg, bolo intravenoso) induce un aumento dependiente de la concentración del flujo sanguíneo clitorídeo (figura 5). Se observó un aumento del 115% del flujo sanguíneo clitorídeo después de una infusión intravenosa de 200 μg/kg de VIP. Esto era significativamente elevado respecto de las infusiones de control (Suero salino heparinizado).

2. Los efectos de VIP sobre el flujo sanguíneo clitorídeo

2390

pueden imitarse por una infusión de un mimético de cAMP, la forscolina (40 nmol/kg, bolo intravenoso, figura 5). Se observó un aumento del 156% del flujo sanguíneo clitorídeo después de una infusión intravenosa de forscolina, 40 nmol/kg. Esto era significativamente elevado respecto de las infusiones de control (Suero salino heparinizado). Obsérvese que la amplitud de la respuesta es similar a la inducida por VIP (200 µg/kg, bolo intravenoso) y comparable a las observadas en el flujo sanguíneo vaginal en las figuras 2 y 4.

3. Los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes estimulan significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico en el flujo sanguíneo clitorídeo (véase la figura 12). Un inhibidor de NEP estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo clitorídeo hasta un 131% comparado con los aumentos de los controles de vehículo.

Estos datos establecen que el VIP es capaz de aumentar el flujo sanguíneo clitorídeo/vasorrelajación y que esto puede imitarse por activación de la ruta de cAMP/adenilato ciclasa. El descubrimiento de que un inhibidor de NEP EC3.4.24.11 (responsable del metabolismo de VIP) potencia el aumento estimulado por el nervio pélvico en el flujo sanguíneo clitorídeo, demuestra que el VIP es un

2391

neurotransmisor que se libera durante la estimulación del nervio pélvico/estimulación sexual.

4.6 *El flujo sanguíneo genital es estimulado por agentes farmacológicos que elevan directa o indirectamente los niveles de cAMP.*

FSAD está asociado a, y puede dar como resultado, una reducción del flujo sanguíneo genital. Los enfoques potenciales para tratar esta enfermedad giran aproximadamente la estimulación del flujo sanguíneo genital. Habiendo establecido que cAMP es el mediador de la vasorrelajación genital y que las elevaciones de cAMP que resultan del VIP liberado neuronalmente, los presentes autores creen que si se estimula la señalización de cAMP, como consecuencia aumentará el flujo sanguíneo genital, restableciendo así el flujo sanguíneo genital a niveles normales y tratando el FSAD.

En un aspecto altamente preferido, los presentes autores han elegido tres objetivos para estimular directa o indirectamente la vasorrelajación mediada por cAMP: los inhibidores de $PDE_{cAMP}$, por ejemplo los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2, los inhibidores de NEP (EC 3.4.24.11) y los antagonistas del receptor de neuropéptido Y Y1 (NPY Y1).

2392

## 4.6.1 Inhibidores de endopeptidasa neutra (NEP EC 3.4.24.11)

La NEP EC 3.4.24.11 metaboliza el VIP y por ello finaliza la actividad biológica mediada por VIP. Los inhibidores de NEP potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del VIP liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión genital.

No ha habido informes previos en la bibliografía sobre la localización de NEP EC 3.4.24.11 o de su papel funcional en el tejido vaginal o de su papel en la excitación sexual.

Los inhibidores selectivos de NE EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos estimulados por nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 6).

Un inhibidor de NEP estimulaba el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal hasta un 53% comparado con los aumentos del control coincidente en el tiempo. Esta potenciación de las frecuencias de estimulación submáximas (por ejemplo 4 Hz), era dependiente de la dosis, por ejemplo 0,1 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 35,0 ± 7,6%, 0,3 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 42,6 ±

27,7% y 1,0 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 52,8 ± 32,5%. Los inhibidores de NEP no tuvieron efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (sin estimular). Por ello, los agentes de la presente invención estimulan la excitación potenciando la señalización de cAMP, más que induciendo la excitación en ausencia de deseo sexual, es decir por aumento directo de la señalización de cAMP.

Los inhibidores selectivos de EP EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico en el flujo sanguíneo clitorídeo (véase la figura 12). Un inhibidor de NEP estimulaba el aumento del pico del flujo sanguíneo clitorídeo hasta un 131% comparado con los aumentos del control de vehículo. Los inhibidores de NEP no tuvieron efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (sin estimular). Esto apoya aún más la creencia de los presentes autores de que los agentes de la presente invención estimularán la excitación potenciando la señalización de cAMP, más que induciendo la excitación en ausencia de deseo sexual, es decir por aumento directo de la señalización de cAMP.

Los inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11 a dosis clínicamente relevantes estimulan significativamente los aumentos inducidos por VIP en el flujo sanguíneo vaginal comparados con los controles coincidente en el tiempo. A dosis submáximas de VIP (por ejemplo 6,0 µg/kg) hay una potenciación significativa tanto en el aumento del pico (95 ± 6%) como en la prolongación de la duración de la estimulación (aproximadamente 140%, desde 7 hasta más de 17 minutos, véase la figura 7). Los inhibidores de NEP prolongan significativamente la duración de la elevación inducida por VIP del flujo sanguíneo vaginal cuando se proporcionan en combinación con una dosis de VIP que produce los aumentos de flujo máximos (aproximadamente un 80% de aumento en una duración de 11 a 20 minutos).

Los inhibidores de NEP a dosis clínicamente relevantes estimulan significativamente las relajaciones inducidas por VIP y mediadas por nervio en tejido aislado. La CE$_{50}$ de VIP se reduce significativamente de 18,8 ± 0,6 nM a 2,9 ± 0,3 nM en presencia de un inhibidor selectivo de NEP (1 µM). El efecto del inhibidor de NEP es dependiente de la concentración.

Se expresan el RNA mensajero y la proteína de NEP EC 3.4.24.11 y se han identificado en vagina humana y de conejo por análisis Northern y Western.

2395

## 4.6.2 Inhibidores de los fosfodiesterasa (PDE)

El cAMP es degradado por la PDE hidrolizante de cAMP, es decir, $PDE_{cAMP}$. Los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ potenciarán el efecto vasorrelajante endógeno del cAMP liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No hay informes en la bibliografía sobre la localización de $PDE_{cAMP}$ o sobre un papel funcional de estas isoenzimas en tejido vaginal, o de un papel en la excitación sexual. Los presentes autores han mostrado, por perfiles de PDE de vagina humana y de conejo, que están presentes las siguientes isoenzimas de $PDE_{cAMP}$ 1, 2, 3, 4, 7 y 8. Los inhibidores de estas $PDE_{cAMP}$ representan agentes potenciales para estimular el flujo sanguíneo vaginal y/o relajar el músculo liso vaginal.

Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 a dosis clínicamente relevantes potencia significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 8). Un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 (500 µg/kg, intravenoso) estimuló el aumento del pico del flujo sanguíneo vaginal en 86,8 ± 21,9% comparado con el aumento observado durante el control coincidente en el tiempo (a 4 Hz).

Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimuló significativamente la duración del aumento inducido por VIP (60 µg/kg) del pico de flujo sanguíneo vaginal por encima del 100% (medido a una amplitud del 50%, véase la figura 9). El inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimuló significativamente el aumento de pico del flujo sanguíneo inducido por la estimulación de VIP (en aproximadamente un 15 ± 3% [200 µg/kg]).

[Un inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2] estimuló significativamente la duración de los aumentos inducidos por VIP del pico del flujo sanguíneo vaginal por encima del 100% (medido a una amplitud del 50%, véase la figura 8). El inhibidor selectivo de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 estimula significativamente el aumento del pico del flujo sanguíneo inducido por estimulación del nervio pélvico (en aproximadamente un 15 ± 3% [200 µg/kg] a 4 Hz).

Los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ estimulan las relajaciones inducidas por VIP de músculo liso vaginal aislado precontraído (fenilefrina 1 µM, véase la tabla 1). Los inhibidores selectivos de $PDE_{cAMP}$ de tipos 1, 2, 3 y 4 potenciaban todos significativamente las relajaciones

mediadas por VIP (210% a 76 nM, 130% a 8 nM, 220% a 3,4 µM y 160% a 686 nM de potenciación de los valores de VIP $CE_{50}$). Estos inhibidores se administraron a dosis que se sabían selectivas para el $PDE_{cAMP}$ de interés. El inhibidor selectivo de $PDE_{cGMP}$ de tipo 5 o el control de vehículo no tenían un efecto viable en las relajaciones mediadas por VIP.

### 4.6.3 Antagonistas del receptor de NPY Y1

El NPY ejerce una influencia inhibitoria sobre la vasorrelajación mediada por VIP y los antagonistas del receptor de NPY Y1 facilitarán el efecto vasorrelajante del VIP endógeno liberado durante la excitación. Esto tendrá el efecto clínico de estimular la congestión vaginal.

No existen informes en la bibliografía sobre la localización del receptor de NPY o de un papel funcional para estos receptores en tejido vaginal o un papel en la excitación sexual.

Los estudios de expresión del receptor de NPY han identificado por análisis Northern y Western que los subtipos de receptor de NPY $Y_1$, $Y_2$ e $Y_5$ están presentes en vagina humana y de conejo.

Los inhibidores selectivos de NPY Y1 a dosis clínicamente relevantes potencian significativamente los aumentos estimulados por el nervio pélvico en el flujo sanguíneo vaginal (véase la figura 10). Un antagonista de NPY Y1 estimuló el aumento de pico del flujo sanguíneo vaginal hasta un 92% comparado con los aumentos del control coincidentes en el tiempo. Esta potenciación de las frecuencias submáximas de estimulación (por ejemplo 4 Hz) era dependiente de la dosis, por ejemplo, 0,01 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 15,8 ± 19,6%, 0,03 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 35,1 ± 17,17%, 0,10 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 60,1 ± 16,9% y 0,3 mg/kg intravenoso indujo un aumento de 91,9 ± 27,4% (media ± s.e.m., n= 3). Los antagonistas de NPY Y1 no tuvieron efecto sobre el flujo sanguíneo vaginal basal (sin estimular). Esto refuerza la creencia de los presentes autores de que estimularán la excitación potenciando la señalización de cAMP, más que induciendo la excitación en ausencia de deseo sexual, es decir por aumento directo de la señalización de cAMP.

### 4.7 *Efectos de los agentes que estimulan cAMP o que aumentan el flujo sanguíneo vaginal sobre la presión sanguínea arterial media en conejo anestesiado.*

En la búsqueda de una terapia oral para FSAD, es deseable que no haya efectos cardiovasculares adversos asociados, por ejemplo efectos sobre la presión sanguínea o sobre el ritmo cardiaco. En los estudios de los presentes autores se ha encontrado que las infusiones de VIP reducen significativamente la presión sanguínea arterial media (véase la figura 3) y aumentan significativamente el ritmo cardiaco. Por ello, en un agente altamente preferido, el agente no es VIP. La estimulación del nervio pélvico y los inhibidores de $PDE_{cAMP}$ y la NEP, sin embargo, no tuvieron efecto sobre la presión sanguínea. A 6,0 µg/kg (intravenoso), el VIP produjo un aumento significativo del ritmo cardiaco de 16 ± 4 latidos por minuto. A dosis mayores tal como 60 µg/kg (intravenoso), el VIP produjo una reducción significativa en la presión sanguínea arterial media de 14,7 ± 1,37 mm Hg y esto se asoció a un aumento significativo del ritmo cardiaco de 111 ± 30 latidos por minuto, lo que aumentó entonces la presión sanguínea arterial media a 8,5 ± 1,4 mm Hg.

2400

COMPUESTOS ENSAYADOS

Se ensayaron una serie de los compuestos mencionados anteriormente según la presente invención y se encontraron eficaces según la presente invención, es decir, pueden actuar como $P_{cAMP}$ para tratar la FSD, en particular del FSAD.

Estos compuestos incluían:

Compuesto de fórmula Ia ("FIa"): a saber, 5-[4-(dietilamino)bencil]-1-metil-3-propil-6,7-dihidro-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-ona. El FIa puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0911333 (ejemplo 50 de éste).

Compuesto de fórmula II ("FII"): a saber, 9-(1-acetil-4-feinlbutil)-2-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-1,9-dihidro-6H-purin-6-ona. El FII puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0771799 (ejemplo 100 de éste).

Compuesto de fórmula III ("FIII"): a saber, milrinona. El FIII es un producto comercialmente disponible.

2401

Compuesto de fórmula IV ("FIV"): a saber, rolipram. El FIV es un producto comercialmente disponible.

Compuesto de fórmula V ("FV"): a saber, éster 3-[[[1-(2-carboxi-4-pentenil)ciclopentil]carbonil]amino]-1-etílico del ácido ciclohexanocarboxílico. El FV puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0274234 (ejemplo 300 de éste).

Compuesto de fórmula VI ("FVI"): a saber, éster 3-[[[1-(2-carboxi-4-pentenil)ciclopentil]carbonil]amino] del ácido ciclohexanocarboxílico. El FVI puede prepararse según las explicaciones del documento EP-A-0274234 (ejemplo 379 de éste).

En particular, los compuestos FIa, FII, FIII y FIV son inhibidores de $PDE_{cAMP}$. FIa es un I:PDEI, FII es un I:PDEII, FIII es un I:PDEIII y FIV es un I:PDEIV.

Los datos para estos compuestos se presentan anteriormente en las secciones de ejemplos anteriores, por ejemplo véase la tabla 1.

Como resulta evidente, estos inhibidores de $PDE_{cAMP}$ estimulan las relajaciones inducidas por VIP de tejido

2402

aislado.

El FII, que es un I:PDEII selectivo, estimula los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relevantes.

El FII potencia también los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y El FVI son inhibidores selectivos de NEP EC 3.4.24.11.

Los datos presentados anteriormente en las secciones de ejemplos anteriores son para el FVI. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares para el FV.

Como resulta evidente, el FV y el FVI estimulan los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI potencian también los aumentos estimulados por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal a dosis clínicamente relavantes.

El FV y el FVI estimulan también las relajaciones inducidas por VIP y mediadas por el nervio de tejido aislado a dosis clínicamente relevantes.

Los compuestos adicionales que se ensayaron y probaron ser eficaces incluyen:

Acido 2-[(1-{[1-bencil-6-oxo-1,6-dihidro-3-piridinil)amino]carbonil}ciclopentil)metil]-4-metoxibutanoico (F57).

Acido 2-{[1-({[3-(2-oxo-1-pirrolidinil)propil]amino}-carbonilciclopentil]metil}-4-fenilbutanoico (F58).

Acido (+)-2-{[1-({[2-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1H-inden-2-il]amino}carbonil)ciclopentil]metil}-4-fenilbutanoico (F59).

Acido 2-[(1-{[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino]carbonil}ciclopentil)metil]-4-fenilbutanoico (F60).

Acido cis-3-(2-metoxietoxi)-2-[(1-{[(4-{[(fenilsulfonil)amino]carbonil}ciclohexil)amino] carbonil}ciclopentil)metil]propanoico (F61).

Acido (+)-2-{[1-({[2-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1H-inden-2-il]amino}carbonil)ciclopentil]metil}pentanoico (F62).

Acido (+)-2-[(1-{[(5-etil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino]carbonil}ciclopentil)metil]pentanoico (F63).

Acido 2-({1-[(3-bencilanilino)carbonil]ciclopentil}-metil)pentanoico (F64).

Acido 2-[(1-{[(1-bencil-6-oxo-1,6-dihidro-3-piridinil)amino]carbonil}ciclopentil)metil]pentanoico (F65).

Acido 2-{[1-({[(1R,3S,4R)-4-(aminocarbonil)-3-butilciclohexil]amino}carbonil)ciclopentil]metil}pentanoico (F66).

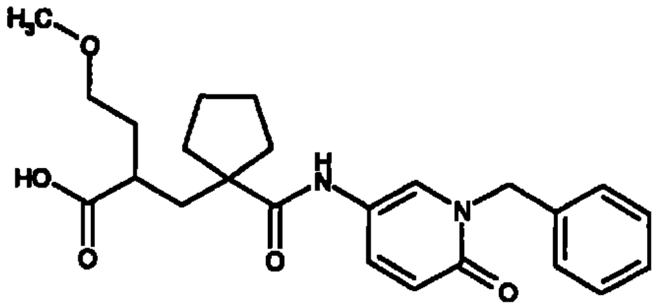
Cada uno de los compuestos F57-66 es un I:NEP.

SINTESIS DE COMPUESTOS F57-66

En el siguiente comentario, los ejemplos de preparación son la síntesis de intermedios, mientras que los ejemplos son la síntesis de los compuestos respectivos de la presente invención.

## Ejemplo 1

## Acido 2-[(1-{[1-bencil-6-oxo-1,6-dihidro-3-piridinil)amino]carbonil}ciclopentil)metil]-4-metoxibutanoico (F57).

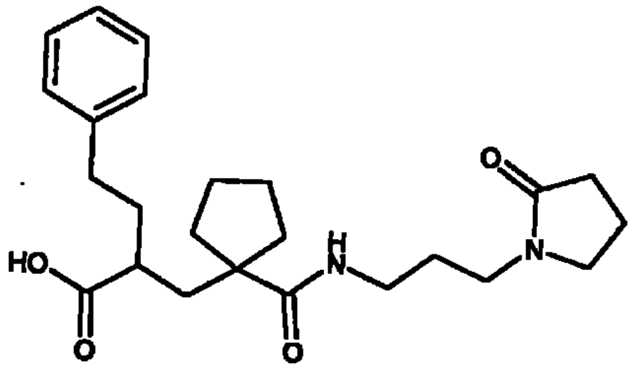


Se hidrogenó a 207 kPa y temperatura ambiente durante 30 minutos una mezcla de éster bencílico de la preparación 1 (1/62) (850 mg, 1,64 mmol) y paladio al 5% sobre carbono (250 mg) en etanol acuoso al 40% (21 ml). Se filtró la mezcla de reacción a través de Hyflo$^{(R)}$ y se evaporó el filtrado a presión reducida. Se purificó la espuma residual por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando diclorometano:metanol (97:3) como eluyente proporcionando el compuesto del título en forma de una espuma blanca, 550 mg, 79%. RMN-$^1$H (DMSO-$d_6$, 300 MHz) $\delta$: 1,24-2,17 (m, 12H), 2,18-2,31 (m, 1H), 3,07 (s, 3H), 3,21 (t, 2H), 5,08 (s, 2H), 6,63 (d, 1H), 7,23-7,41 (m, 5H), 7,72 (d, 1H), 8,24 (s, 1H).

Anal. Encont. C 67,46, H 7,18, N 6,24. $C_{24}H_{30}N_2O_5$ requiere C 67,58, H 7,09, N 6,57%.

### Ejemplo 2

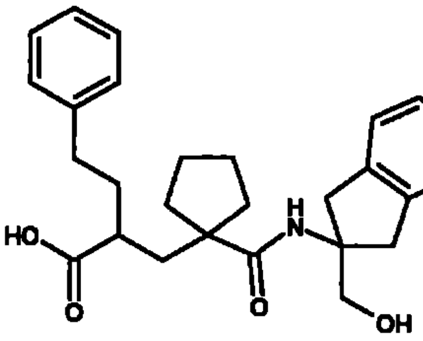
### Acido 2-{[1-({[3-(2-oxo-1-pirrolidinil)propil]amino}-carbonilciclopentil]metil}-4-fenilbutanoico (F58).



Se hidrogenó a 414 kPa de presión de $H_2$ y temperatura ambiente durante 1,5 horas una mezcla de éster bencílico de la preparación 3 (3/67) (780 mg, 1,55 mmol) y paladio al 10% sobre carbón (100 mg) en etanol:agua (90:10 en volumen) (30 ml). Se filtró el catalizador, y se evaporó el filtrado a presión reducida proporcionando el compuesto del título en forma de una espuma blanca, 473 mg, 74%. RMN-$^1H$ ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta$: 1,26-1,77 (m, 10H), 1,78-2,46 (m, 11H), 2,49-2,70 (m, 2H), 2,95-3,36 (m, 4H), 6,92-7,38 (m, 5H). Anal. Encont. C 64,05, H 7,73, N 6,22. $C_{24}H_{34}N_2O_4 \cdot 0,75H_2O$ requiere C 65,88, H 7,83, N 6,40%.

## Ejemplo 3

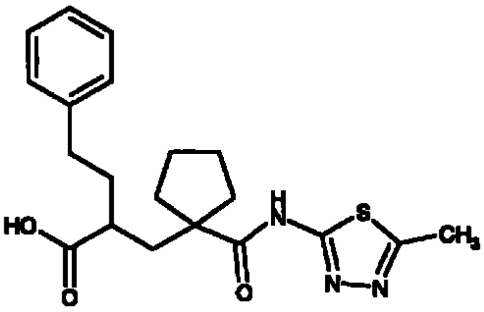
### Acido (+)-2-{[1-({[2-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1H-inden-2-il]amino}carbonil)ciclopentil]metil}-4-fenilbutanoico (F59).



El ácido 2-{[1-({[2-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1H-inden-2-il]amino}carbonil)ciclopentil]metil}-4-fenilbutanoico (documento WO 9110644) puede purificarse por procedimientos estándar de HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) utilizando una columna AD y hexano:isopropanol:ácido trifluoroacético (70:30:0,2) como eluyente, proporcionando el compuesto del título del ejemplo 3, 99,5% ee, $[\alpha]_D$= +9,1° (c= 1,76 en etanol).

## Ejemplo 4

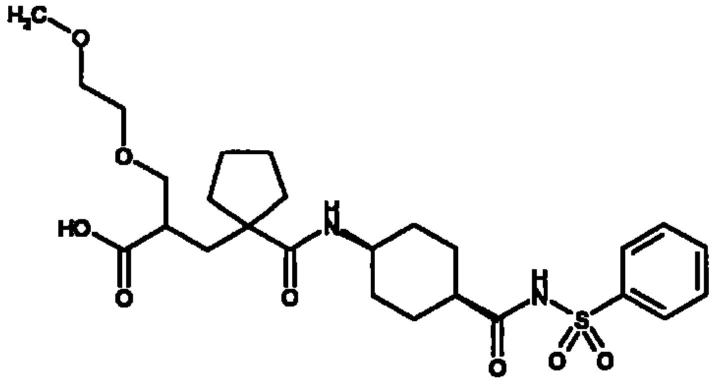
### Acido 2-[(1-{[(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino]carbonil}ciclopentil)metil]-4-fenilbutanoico (F60).



Se hidrogenó a 414 kPa durante 18 horas una mezcla del éster bencílico de la preparación 4 (4/70) (187 mg, 0,39 mmol) y paladio al 10% sobre carbón (80 mg) en etanol (20 ml). El análisis por TLC (Cromatografía en capa fina) mostró que quedaba material de partida, de modo que se añadió más paladio al 10% sobre carbón (100 mg) y la reacción continuó durante otras 5 horas. Los análisis de TLC mostraron de nuevo que quedaba material de partida, de modo que se añadió más catalizador (100 mg) y continuó la hidrogenación durante 18 horas. Se filtró la mezcla a través de Arbocel<sup>(R)</sup>, se concentró el filtrado a presión reducida y se destiló azeotrópicamente con diclorometano. Se purificó el producto en bruto por cromatografía sobre gel de sílice utilizando una columna Biotage<sup>(R)</sup> y diclorometano:metanol (95:5) como eluyente proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite transparente, 80 mg, 53%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta$: 1,51-1,89 (m, 9H), 2,03 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 2,40 (m, 2H), 2,60 (m, 5H), 7,15-7,30 (m, 5H). LRMS (Espectrometría de masas de baja resolución): m/z 387,8 (MH$^+$).

## Ejemplo 5

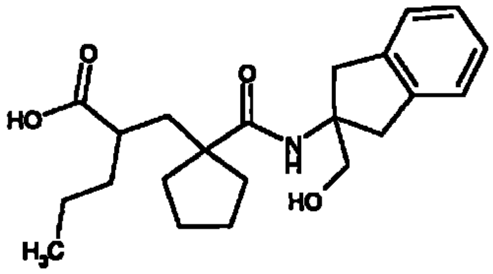
### Acido cis-3-(2-metoxietoxi)-2-[(1-{[(4-{[(fenilsulfonil)amino]carbonil}ciclohexil)amino]carbonil}ciclopentil)metil]propanoico (F61).



Se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas una disolución del éster terc-butílico de la preparación 8 (8/66) (446 mg, 0,75 mmol) en diclorometano (5 ml) y ácido trifluoroacético (5 ml). Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se destiló azeotrópicamente el residuo con diclorometano, luego tolueno y finalmente éter, proporcionando el compuesto del título en forma de una espuma blanca, 385 mg, 95%. RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 400 MHz) δ: 1,48-2,17 (m, 18H), 2,40 (s, 1H), 2,66 (s, 1H), 3,37 (s, 3H), 3,50-3,70 (m, 6H), 3,94 (s, 1H), 6,10 (d, 1H), 6,59 (s, 1H), 7,55 (t, 2H), 7,61 (m, 1H), 8,02 (d, 2H), 9,11 (s, 1H). Anal. encontr.: C 54,88, H 6,90, N 5,04. $C_{26}H_{38}N_2O_8S$.1,7$H_2O$ requiere C 57,97, H 7,11, N 5,20%.

## Ejemplo 6

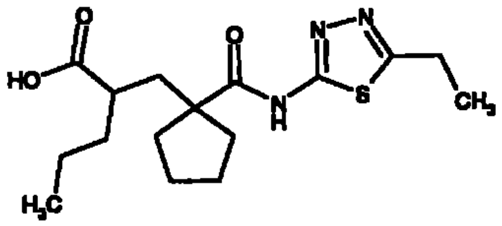
Acido (+)-2-{[1-({[2-(hidroximetil)-2,3-dihidro-1H-inden-2-il]amino}carbonil)ciclopentil]metil}pentanoico (F62).



Se purificó adicionalmente ácido 2-{[1-({[2-hidroximetil)-2,3-dihidro-1H-inden-2-il]amino}carbonil)ciclopentil]metil} pentanoico (documento WO 9110644) por HPLC utilizando una columna AD y hexano:isopropanol:ácido trifluoroacético (90:10:0,1) como eluyente, proporcionando el compuesto del título del ejemplo 6, 99% ee, $[\alpha]_D$= +10,4° (c= 0,067, etanol).

## Ejemplo 7

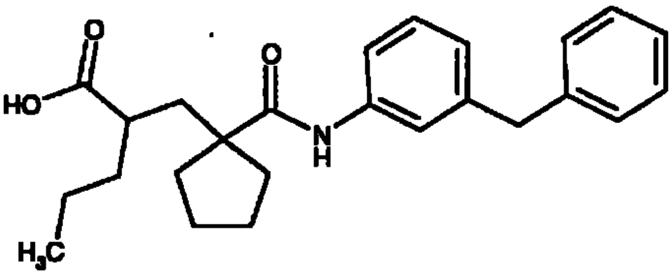
Acido (+)-2-[(1-{[(5-etil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino]carbonil}ciclopentil)metil]pentanoico (F63).



Se purificó adicionalmente el ácido de la preparación 18 (18/ej4) (824 mg) por HPLC utilizando una columna AD y utilizando hexano:isopropanol:ácido trifluoroacético (85:15:0,2) como eluyente, proporcionando el compuesto del título del ejemplo 7 en forma de una espuma blanca, 386 mg, 99% ee. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 0,90 (t, 3H), 1,38 (m, 6H), 1,50-1,79 (m, 9H), 2,19 (m, 1H), 2,30 (m, 1H), 2,44 (m, 1H), 2,60 (m, 1H), 2,98 (q, 2H), 12,10-12,27 (s ancho, 1H). LRMS: m/z 338 ($MH^-$), y $[\alpha]_D$= +3,8° (c= 0,1, metanol).

### Ejemplo 8

### Acido 2-({1-[(3-bencilanilino)carbonil]ciclopentil}-metil)pentanoico (F64).



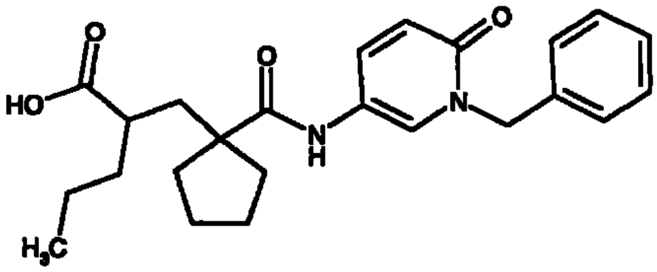
Se hidrogenó a 207 kPa y temperatura ambiente durante 2

2412

horas una mezcla de éster bencílico de la preparación 10 (10/53) (1,3 mg, 2,47 mmol) y paladio al 5% sobre carbón (130 mg) en agua (10 ml) y etanol (40 ml). Se filtró la mezcla de reacción a través de Arbocel®, se concentró el filtrado a presión reducida y se trituró el residuo con diclorometano. Se trituró la goma residual con éter, y después con hexano y se secó a 50°C proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido, 0,79 g, 81%. RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 300 MHz) δ: 0,95 (t, 3H), 1,24-1,51 (m, 3H), 1,58-1,80 (m, 7H), 1,88 (dd, 1H), 2,15 (m, 2H), 2,24 (m, 1H), 2,48 (m, 1H), 4,00 (s, 2H), 6,98 (d, 1H), 7,24 (m, 6H), 7,40 (m, 3H). Anal. Encont. C 75,48, H 7,76, N 3,59. $C_{25}H_{31}NO_3 \cdot 0,25H_2O$ requiere C 75,44, H 7,98, N 3,51%.

**Ejemplo 9**

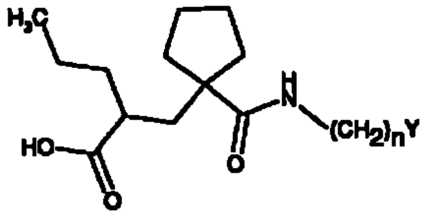
**Acido 2-[(1-{[(1-bencil-6-oxo-1,6-dihidro-3-piridinil)amino]carbonil}ciclopentil)metil]pentanoico (F65).**



Se obtuvo el compuesto del título en forma de una espuma blanca con un 51% de rendimiento a partir del éster bencílico de la preparación 13 (13/56) siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 19 (19/ej21) excepto porque el producto se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo como eluyente. RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 300 MHz) $\delta$: 0,96 (t, 3H), 1,28-1,80 (m, 12H), 2,01 (m, 1H), 2,30-2,52 (m, 2H), 5,02 (dd, 2H), 6,60 (d, 1H), 7,27 (m, 5H), 7,70 (s, 1H), 8,34 (s, 1H). Anal. Encont. C 69,52, H 7,41, N 6,51. $C_{24}H_{30}N_2O_4 \cdot 0,25H_2O$ requiere C 69,45, H 7,41, N 6,75%.

### Ejemplo 10

### Acido 2-{[1-({[(1R,3S,4R)-4-(aminocarbonil)-3-butilciclohexil]amino}carbonil)ciclopentil]metil}pentanoico (F66).



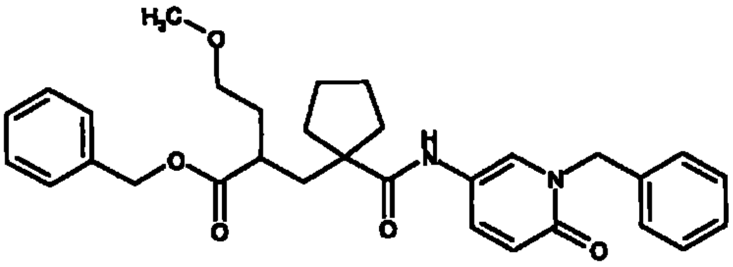
(Ic)

Los compuestos de fórmula ic, es decir, compuestos de fórmula general i en la que r$^1$ es propilo, se prepararon a partir del correspondiente éster terc-butílico, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 14

(14/ej1).

## Preparación 1 (1/62)

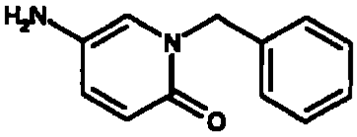
## 2-[(1-{[(1-Bencil-6-oxo-1,6-dihidro-3-piridinil)amino]carbonil}ciclopentil)metil]-4-metoxibutanoato de bencilo



Se añadió cloruro de oxalilo (0,26 ml, 3,0 mmol) a una disolución enfriada con hielo de ácido 1-{2-[(benciloxi)carbonil]-4-metoxibutil}ciclopentanocarboxílico (documento EP 274234) (1,0 g, 3,0 mmol) y N,N-dimetilformamida (2 gotas) en diclorometano (20 ml) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se concentró la disolución a presión reducida y se destiló azeotrópicamente el residuo con diclorometano (3 x 10 ml). Se disolvió el producto en diclorometano (20 ml), después se enfrió en baño de hielo. Se añadieron la amina de la preparación 2 (2/28) (600 mg, 3 mmol) y N-metilmorfolina (0,6 ml, 5,45 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se repartió entre agua y éter. Se lavó la capa orgánica con ácido clorhídrico (2 N), disolución de bicarbonato de sodio y después agua, se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida. Se purificó el sólido verde residual por cromatografía de columna de presión media sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo:hexano (90:10) como eluyente, proporcionando el compuesto del título, 880 mg, 57%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 1,37-2,28 (m, 12H), 2,46-2,64 (m, 1H), 3,20 (s, 3H), 3,31 (m, 2H), 4,97 (dd, 2H), 5,08 (dd, 2H), 6,57 (d, 1H), 7,12 (m, 1H), 7,18-7,48 (m, 10H), 8,08 (d, 1H).

## Preparación 2 (2/28)

## 5-Amino-1-bencil-2(1H)piridinona



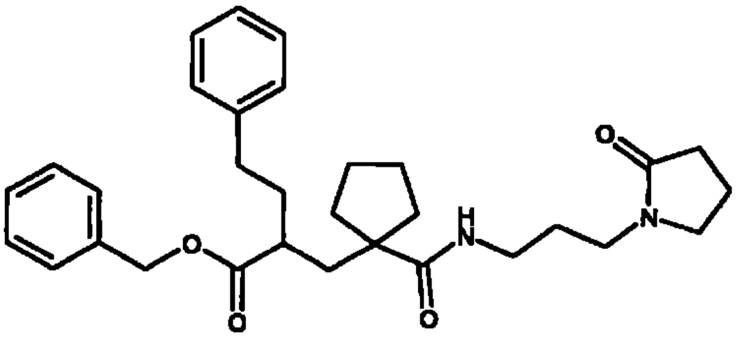
Se calentó a 90°C durante 1,5 horas una mezcla de 1-bencil-5-nitro-1H-piridin-2-ona (Justus Liebig Ann. Chem. 484, 1930, 52) (1,0 g, 4,35 mmol) y estaño granulado (3,5 g, 29,5 mmol) en ácido clorhídrico concentrado (14 ml). Se diluyó con agua la disolución enfriada se neutralizó utilizando una disolución de carbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (250 ml en total). Se filtraron los extractos orgánicos combinados, se secaron

2416

(MgSO$_4$) y se evaporaron a presión reducida proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido verde pálido (que se vuelve azul con el tiempo), 440 mg, 51%. RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 250 MHz) δ: 4,12-4,47 (s ancho, 2H), 5,00 (s, 2H), 6,31 (d, 1H), 6,86 (s, 1H), 7,07 (m, 1H), 7,14-7,42 (m, 5H).

## Preparación 3 (3/67)

## 2-{[1-({[3-(2-Oxo-1-pirrolidinil)propil]amino}-carbonilciclopentil]metil}-4-fenilbutanoato de bencilo

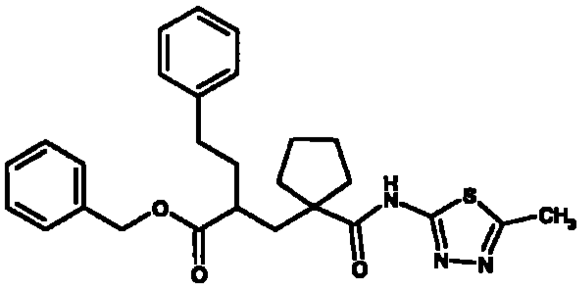


Se añadieron secuencialmente clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,06 g, 5,53 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,60 g, 4,44 mmol) y 4-metilmorfolina (0,56 g, 5,54 mmol) a una disolución enfriada de ácido 1-{2-[(benciloxi)carbonil]-4-fenilbutil}ciclopentanocarboxílico (documento EP 274234) (1,5 g, 3,94 mmol) en diclorometano seco (15 ml) a temperatura ambiente, seguido de N-(3-aminopropil)-2-

pirrolidinona (0,56 g, 3,94 mmol) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. Se lavó la mezcla con agua, ácido clorhídrico 2 N y disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y después se secó ($MgSO_4$) y evaporó a presión reducida. Se purificó el aceite amarillo residual por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo:pentano (50:50) como eluyente, proporcionando el compuesto del título en forma de una goma transparente, 800 mg, 40%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta$: 1,37-2,20 (m, 16H), 2,34-2,58 (m, 5H), 2,92-3,46 (m, 6H), 5,07 (d, 1H), 5,18 (d, 1H), 6,98-7,47 (m, 10H).

### Preparación 4 (4/70)

### 2-[(1-{[(5-Metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)amino]carbonil}ciclopentil)-metil]-4-fenilbutanoato de bencilo

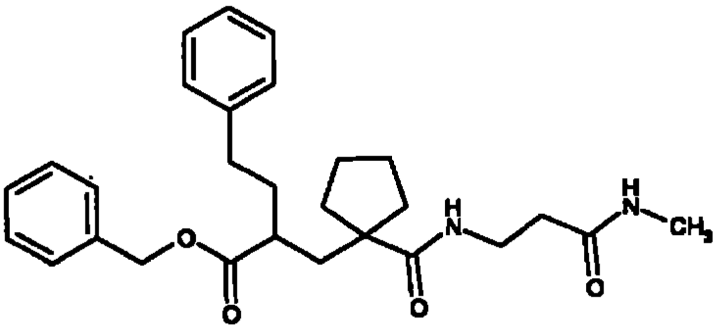


Se obtuvo el compuesto del título en forma de un aceite transparente con un rendimiento del 74% a partir de ácido 1-{2-[(benciloxi)carbonil]-4-fenilbutil}-

ciclopentanocarboxílico (documento EP 274234) y 2-amino-5-metil-1,3,4-tiadiazol, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 5 (5/68). RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 1,58-1,76 (m, 7H), 1,83-1,98 (m, 3H), 2,03 (m, 1H), 2,20 (m, 1H), 2,35 (m, 1H), 2,44 (m, 3H), 2,65 (s, 3H), 5,02 (dd, 2H), 7,00 (d, 2H), 7,15 (m, 1H), 7,19 (m, 2H), 7,35 (m, 5H). LRMS: m/z 478,7 (MH$^+$).

## Preparación 5 (5/68)

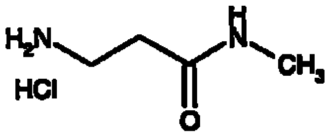
### 2-{[1-({[3-(metilamino)-3-oxopropil]amino}-carbonil)ciclopentil]metil}-4-fenilbutanoato de bencilo



Se añadieron secuencialmente clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (122 mg, 0,64 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (86 mg, 0,64 mmol) y 4-metilmorfolina (173 µl, 1,59 mmol) a una disolución enfriada de ácido 1-{2-[(benciloxi)carbonil]-4-fenilbutil}ciclopentanocarboxílico (documento EP 274234) (202 mg, 0,53 mmol) en N,N-dimetilformamida (5 ml) a temperatura ambiente, seguido del clorhidrato de amina de la preparación 6 (6/23) (146 mg, 1,06 mmol) y se agitó la reacción a 90°C durante 18 horas. Se concentró la disolución enfriada a presión reducida y se repartió el residuo entre agua (20 ml) y acetato de etilo (100 ml). Se separaron las capas, se lavó la fase orgánica con agua (3 x 30 ml) y salmuera (25 ml), se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida proporcionando un aceite transparente. Se purificó el producto en bruto por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando diclorometano:metanol (98:2) como eluyente, proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite incoloro, 162 mg, 67%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) $\delta$: 1,38-1,53 (m, 2H), 1,53-1,96 (m, 8H), 2,02 (m, 2H), 2,27 (t, 2H), 2,46 (m, 3H), 2,76 (d, 3H), 3,44 (m, 2H), 5,13 (s, 2H), 5,79 (s ancho, 1H), 6,38 (m, 1H), 7,06 (d, 2H), 7,18 (m, 1H), 7,22 (m, 2H), 7,38 (m, 5H). LRMS: m/z 465,5 ($MH^+$).

## Preparación 6 (6/23)

## Clorhidrato de 3-amino-N-metilpropanamida

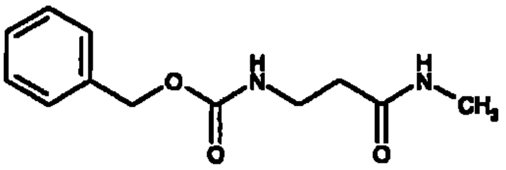


Se hidrogenó a 345 kPa y temperatura ambiente durante 4 horas una mezcla del carbamato de bencilo de la preparación 7 (7/13) (7,92 g, 33,5 mmol) y paladio al 5% sobre carbón

(800 mg) en etanol (300 ml). Se filtró la mezcla de reacción a través de Arbocel®, se lavó con etanol y se añadió ácido clorhídrico 1 N (36,9 ml, 36,9 mmol) al filtrado combinado. Se evaporó esta disolución a presión reducida y se destiló azeotrópicamente el residuo con diclorometano, proporcionando el compuesto del título en forma de una espuma incolora, 4,66 g. RMN-$^1$H (DMSO-$d_6$, 300 MHz) δ: 2,46 (t, 2H), 2,60 (s, 3H), 2,95 (m, 2H), 7,98-8,16 (m, 2H).

### Preparación 7 (7/13)

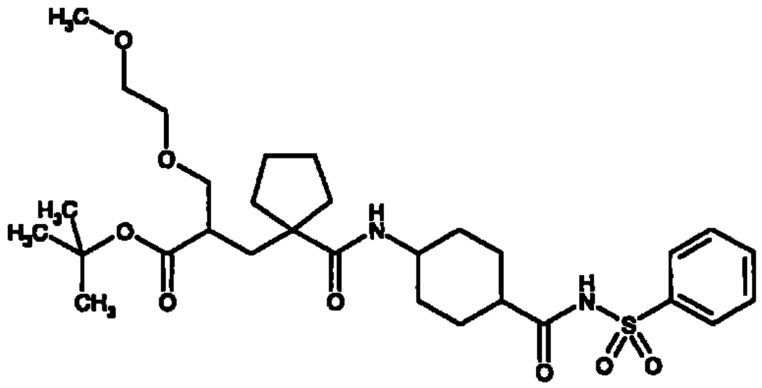
### 3-(Metilamino)-3-oxopropilcarbamato de bencilo



Se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas una mezcla de N-[(benciloxi)carbonil]-β-alanina (10 g, 44,8 mmol), clorhidrato de metilamina (3,33 g, 49,28 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (6,05 g, 44,8 mmol), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (10,3 g, 53,76 mmol) y N-metilmorfolina (11,33 ml, 103 mmol) en diclorometano (200 ml). Se filtró el precipitado resultante proporcionando el producto deseado en forma de una espuma incolora y se evaporó el filtrado a presión reducida. Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando un gradiente de elución de acetato de etilo:hexano (90:10 a 100:0) proporcionando producto adicional, 7,96 g, 75% en total. RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 300 MHz) δ: 2,42 (t, 2H), 2,80 (s, 3H), 3,50 (m, 2H), 5,21 (s, 2H), 5,49 (s ancho, 1H), 5,63 (s ancho, 1H), 7,36 (m, 5H). Anal. Encont.: C 60,68, H 7,00, N 11,95. $C_{12}H_{16}N_2O_3$ requiere C 61,00, H 6,83, N 11,86%.

## Preparación 8 (8/66)

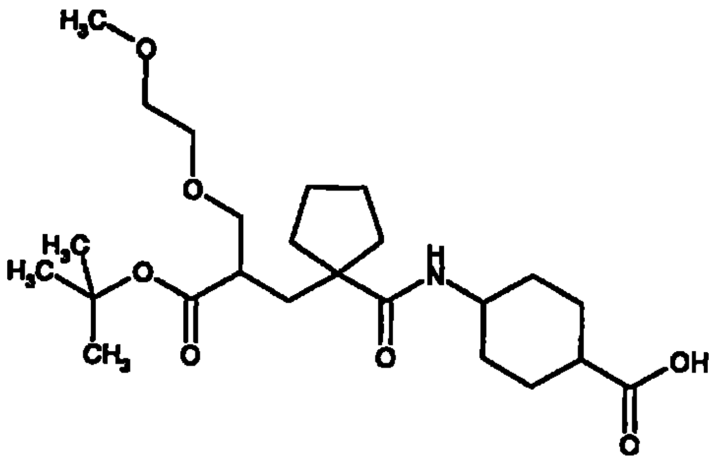
### 3-(2-Metoxietoxi)-2-[(1-{[(4-{[(fenilsulfonil)-amino]carbonil}-ciclohexil)amino]carbonil}-cilopentil)metil]propanoato de cis-terc-butilo



Se añadieron N,N'-diciclohexilcarbodiimida (199 mg, 0,97 mmol), 4-dimetilaminopiridina (118 mg, 0,97 mmol) y bencenosulfonamida (152 mg, 0,97 mmol) a una disolución enfriada con hielo del ácido de la preparación 9 (9/63) (400 mg, 0,878 mmol) en diclorometano (12 ml) y N,N-dimetilformamida (0,5 ml) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 20 horas. Se concentró la mezcla a presión reducida y se suspendió el residuo en acetato de etilo frío. Se filtró el material insoluble resultante, se lavó el filtrado con ácido clorhídrico (1 N) y agua, después se secó ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida. Se purificó el producto en bruto por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando un gradiente de elución de diclorometano:metanol (95:5 a 90:10) proporcionando el compuesto del título en forma de una espuma blanca, 480 mg, 92%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) $\delta$: 1,44 (s, 9H), 1,63 (m, 13H), 1,80 (m, 2H), 1,88 (m, 1H), 1,98 (m, 2H), 2,36 (m, 1H), 2,57 (m, 1H), 3,38 (s, 3H), 3,40 (m ,1H), 3,51 (t, 2H), 3,58 (m, 3H), 3,95 (m, 1H), 5,92 (d, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,62 (m, 1H), 8,05 (d, 2H), 8,75 (s ancho, 1H). LRMS: m/z 618 ($MNa^+$).

### Preparación 9 (9/63)

### Acido 4-{[(1-{3-terc-Butoxi-2-[(2-metoxietoxi)metil]-3-oxopropil}ciclopentil)carbonil]amino}ciclohexanocarboxílico

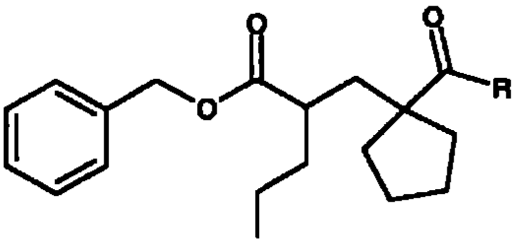


Se hidrogenó a 345 kPa a temperatura ambiente durante 18 horas una mezcla de 4-{[(1-{3-terc-butoxi-2-[(2-metoxietoxi)metil]-3-oxopropil}ciclopentil)carbonil]amino} ciclohexanocarboxilato de bencilo (documento EP 274234) y paladio al 10% sobre carbón (250 mg) en agua (10 ml) y etanol (50 ml). Se filtró la mezcla de reacción a través de Solkafloc$^{(R)}$, se concentró el filtrado a presión reducida y se destiló azeotrópicamente el residuo con tolueno (3x) y después con diclorometano (3x) proporcionando el compuesto del título, 2,0 g, 96%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta$: 1,48 (s, 9H), 1,53-1,84 (m, 14H), 1,94-2,10 (m, 5H), 2,60 (m, 2H), 3,40 (s, 3H), 3,41-3,63 (m, 5H), 3,96 (m, 1H), 5,90 (d ancho, 1H).

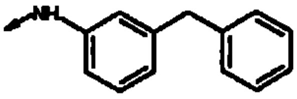
**Preparación 10 (10/53)**

El siguiente compuesto

2424



en el que:

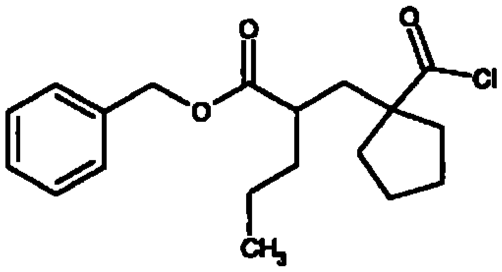
| Prep. | R | Rendim. (%) | Datos |
|---|---|---|---|
| 10 (10/53)$^{1}$ |  | 90 | RMN-$^{1}$H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 0,84 (t, 3H), 1,24 (m, 2H), 1,40-1,76 (m, 7H), 1,84 (dd, 1H), 1,98 (m, 1H), 2,19 (dd, 1H), 2,28 (m, 1H), 2,56 (m, 1H), 3,98 (s, 2H), 4,99 (dd, 2H), 6,98 (d, 1H), 7,19-7,42 (m, 15H). |

1= diclorometano utilizado como eluyente de la columna

se preparó a partir del cloruro de ácido de la preparación 11 (11/3) y la amina apropiada, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 12 (12/52).

### Preparación 11 (11/3)

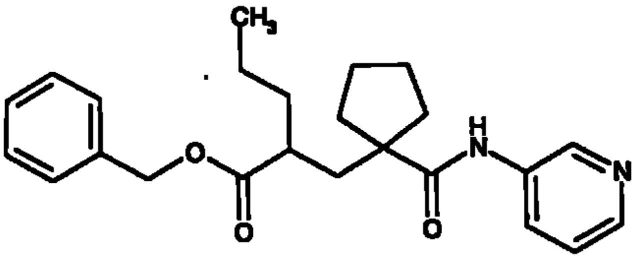
### 2-{[1-(Clorocarbonil)ciclopenil]metil}pentanoato de bencilo



Se añadió cloruro de oxalilo (1,15 ml, 13,2 mmol) a una disolución enfriada en hielo de ácido 1-{2-[(benciloxi)carbonil]pentil}ciclopentanocarboxílico (documento EP 274234) (2,0 g, 6,3 mmol) en diclorometano seco (20 ml) y se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 2 horas. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se destiló azeotrópicamente el residuo con diclorometano (3x) proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite dorado, 2,1 g. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ: 0,88 (t, 3H), 1,28 (m, 2H), 1,43 (m, 2H), 1,63 (m, 6H), 2,00 (m, 1H), 2,08-2,35 (m, 3H), 2,44 (m, 1H), 5,15 (s, 2H), 7,28 (m, 5H).

### Preparación 12 (12/52)

### 2-({1-[(3-Piridinilamino)carbonil]ciclopentil}metil)pentanoato de bencilo

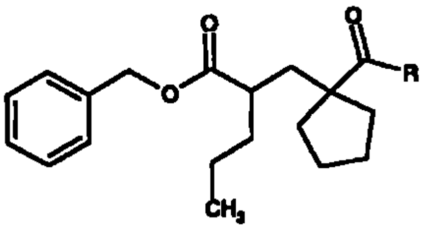


Se añadió trietilamina (0,11 ml, 0,78 mmol) a una mezcla del cloruro de ácido de la preparación 11 (11/3) (200 mg, 0,60 mmol) y 2-aminopiridina (61 mg, 0,65 mmol) en diclorometano (3 ml) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se evaporó la mezcla a presión reducida, se repartió el residuo entre disolución de bicarbonato de sodio (5 ml) y acetato de etilo (20 ml) y se separaron las capas. Se secó la fase orgánica ($MgSO_4$) y se evaporó a presión reducida proporcionando una goma. Se purificó el producto en bruto por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando acetato de etilo como eluyente, proporcionando el compuesto del título, 130 mg. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) $\delta$: 0,82 (t, 3H), 1,21 (m, 3H), 1,40 (m, 1H), 1,43-1,72 (m, 6H), 1,81 (d, 1H), 1,98 (m, 1H), 2,18 (m, 1H), 2,24 (m, 1H), 2,46 (m, 1H), 4,98 (m, 2H), 7,20-7,38 (m, 6H), 7,42 (s, 1H), 8,06 (d, 1H), 8,35 (d, 1H), 8,56 (s, 1H).

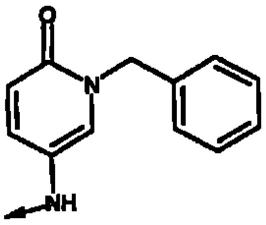
2427

## Preparación 13 (13/56)

El siguiente producto:



en el que

| Prep. | R | Rendim. (%) | Datos |
|---|---|---|---|
| 13 (13/56)$^2$ |  | 53 | RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 300 MHz) δ: 0,84 (t, 3H), 1,25 (m, 2H), 1,27-1,99 (m, 10H), 2,07-2,30 (m, 2H), 2,47 (m, 1H), 4,99 (s, 2H), 5,10 (dd, 2H), 6,59 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,34 (m, 11H), 8,10 (s, 1H). |

2= N-metilmorfolina utilizada como base

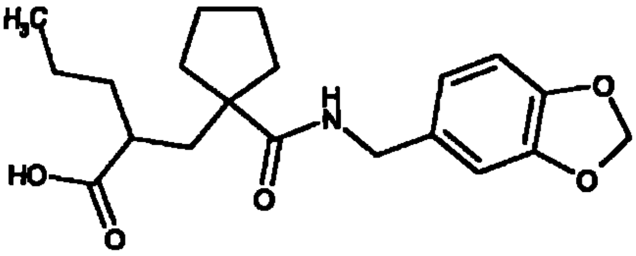
se preparó a partir del cloruro de ácido de la preparación 11 (11/3) y la amina apropiada, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 12 (12/52).

## Preparación 14 (14/ej1)

## Acido 2-({1-[1,3-benzodioxol-5-ilamino)carbonil]-

2428

ciclopentil}metil)pentanoico

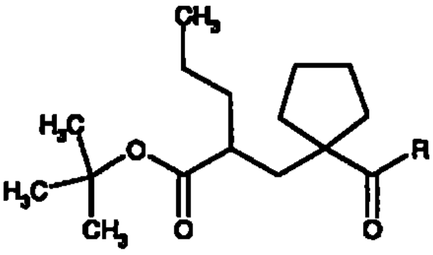


Se añadió ácido trifluoroacético (5 ml) a una disolución de éster terc-butílico de la preparación 15 (15/34) (130 mg, 0,31 mmol) en diclorometano (5 ml), y se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 4 horas. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida y se destiló azeotrópicamente el residuo con tolueno y diclorometano proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite transparente, 112 mg. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 0,83 (t, 3H), 1,22-1,40 (m, 3H), 1,50-1,72 (m, 8H), 1,95 (m, 1H), 2,10 (m, 2H), 2,19 (m, 1H), 4,30 (m, 2H), 5,93 (s, 2H), 5,99 (s ancho, 1H), 6,74 (m, 3H). LRMS: m/z 380 (MH$^-$).

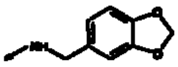
**Preparación 15 (15/34)**

El siguiente compuesto:

2429



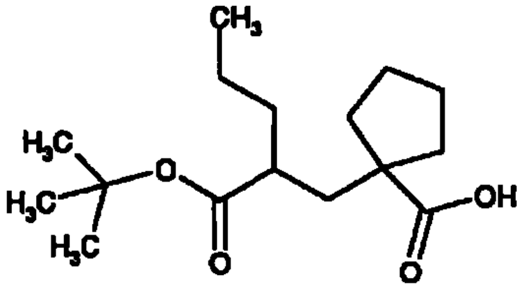
en el que

| Prep. | R | Amina de partida | Rend. (%) | Datos |
|---|---|---|---|---|
| 15 (15/34) |  | piperonilamina | 88 | RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 0,85 (t, 3H), 1,26 (m, 4H), 1,42 (s, 9H), 1,46 (m, 2H), 1,59-1,75 (m, 5H), 1,95 (m, 2H), 2,06 (m, 1H), 2,22 (m, 1H), 4,26 (dd, 1H), 4,39 (dd, 1H), 5,95 (m, 3H), 6,78 (m, 3H). LRMS: m/z 418,3 ($MH^+$) |

se preparó a partir del ácido de la preparación 16 (16/1) y el compuesto amina apropiado, siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 17 (17/33).

## Preparación 16 (16/1)

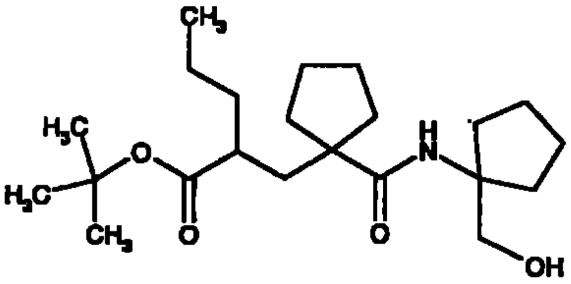
## Acido 1-[2-(terc-butilcarbonil)-4-pentil]ciclopentanocarboxílico



Se hidrogenó a 207 kPa a temperatura ambiente durante 18 horas una mezcla de ácido 1-[2-(terc-butoxicarbonil)-4-pentenil]ciclopentanocarboxílico (documento EP 274234) (23 g, 81,5 mmol) y paladio al 10% sobre carbón (2 g) en etanol seco (200 ml). Se filtró la mezcla de reacción a través de Arbocel® y se evaporó el filtrado a presión reducida proporcionando un aceite amarillo. Se purificó el producto en bruto por cromatografía en columna sobre gel de sílice, utilizando acetato de etilo:pentano (40:60) como eluyente, proporcionando el producto deseado en forma de un aceite transparente, 21 g, 91%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$) 0,86 (t, 3H), 1,22-1,58 (m, 15H), 1,64 (m, 4H), 1,78 (dd, 1H), 2,00-2,18 (m, 3H), 2,24 (m, 1H). LRMS: m/z 283 $(M-H)^-$.

**Preparación 17 (17/33)**

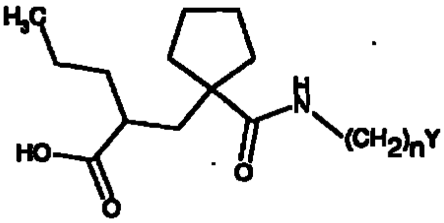
**2-{[1-({[1-(hidroximetil)ciclopentil]amino}carbonil)-ciclopentil]metil}pentanoato de terc-butilo**



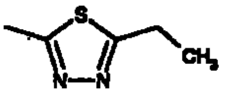
Se añadieron clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (41 mg, 0,21 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (27 mg, 0,2 mmol), N-metilmorfolina (35 μl, 0,31 mmol) y finalmente 1-amino-1-ciclopentanometanol (25 mg, 0,22 mmol) a una disolución del ácido de la preparación 16 (16/1) (150 mg, 0,53 mmol) en N,N-dimetilformamida (3 ml) y se agitó la reacción a 90°C durante 18 horas. Se diluyó la disolución enfriada con acetato de etilo (90 ml), se lavó con agua (3 x 25 ml) y salmuera (25 ml) y después se secó ($MgSO_4$) y evaporó a presión reducida. Se purificó el producto en bruto por cromatografía sobre gel de sílice, utilizando acetato de etilo:pentano (30:70) como eluyente para proporcionar el compuesto del título, 38 mg, 57%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ: 0,88 (t, 3H), 1,29 (m, 3H), 1,41-1,78 (m, 26H), 1,78-1,98 (m, 4H), 2,04 (m, 1H), 2,26 (m, 1H), 3,59 (dd, 1H), 3,70 (dd, 1H), 4,80 (t, 1H), 5,81 (s, 1H). LRMS: m/z 380 $(MH)^-$.

## Preparación 18 (18/ej4)

Se preparó un compuesto de fórmula la mostrada a continuación a partir del correspondiente éster terc-butílico siguiendo un procedimiento similar al descrito en la preparación 14 (14/ej1).



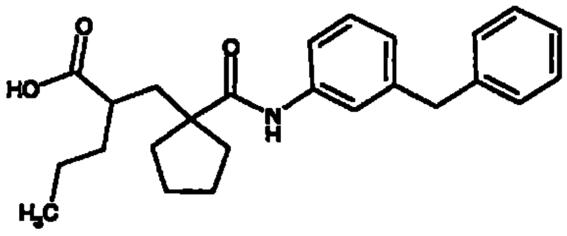
(Ic)

| Ej. | N | R | Rendim. (%) | Datos |
|---|---|---|---|---|
| 18 (18/ej4)$^3$ | 0 |  | 86 | RMN-$^1$H (CDCl$_3$, 400 MHz) δ: 0,92 (t, 3H), 1,35 (t, 3H), 1,25-1,80 (m, 11H), 2,20-2,50 (m, 4H), 2,95 (q, 2H), 12,10 (s ancho, 1H).<br>LRMS: m/z 339,8 (MH$^+$).<br>Anal. Encont. C 56,46, H 7,46, N 12,36. $C_{16}H_{25}N_3O_3S$ requiere C 56,62, H 7,44, N 12,37% |

3= recristalizado con éter

## Preparación 19 (19/ej21)

### Acido 2-({1-[(3-bencilanilino)carbonil]-ciclopentil}metil)pentanoico



Se hidrogenó a 207 kPa a temperatura ambiente durante 2 horas una mezcla de éster bencílico de la preparación 10 (10/53) (1,3 mg, 2,47 mmol) y paladio al 5% sobre carbón (130 mg) en agua (10 ml) y etanol (40 ml). Se filtró la mezcla de reacción a través de Arbocel$^{(R)}$, se concentró el precipitado a presión reducida y se trituró el residuo con diclorometano. Se trituró la goma residual con éter, después con hexano, y se secó a 50°C proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido, 0,79 g, 81%. RMN-$^1$H ($CDCl_3$, 300 MHz) $\delta$: 0,95 (t, 3H), 1,24-1,51 (m, 3H), 1,58-1,80 (m, 7H), 1,88 (dd, 1H), 2,15 (m, 2H), 2,24 (m, 1H), 2,48 (m, 1H), 4,00 (s, 2H), 6,98 (d, 1H), 7,24 (m, 6H), 7,40 (m, 3H). Anal. Encont. C 75,48, H 7,76, N 3,59. $C_{25}H_{31}NO_3.0,25H_2O$ requiere C 75,44, H 7,98, N 3,51%

ENSAYO ACE

PREPARACION Y ENSAYO DE ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

2434

SOLUBLE (ACE) A PARTIR DE CORTEZA RENAL PORCINA Y HUMANA

La actividad ACE soluble se obtiene a partir de la corteza renal y se ensaya por medición de la tasa de corte del sustrato de ACE Abz-Gly-para-nitro-Phe-Pro-OH para generar el producto fluorescente, Abz-Gly.

## 1. MATERIALES

Toda el agua está doblemente desionizada.

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 | Riñón humano | IIAM (Pennsylvania, EE.UU.) o Human Tissue Bank del Reino Unido (UK HTB) |
| 1.2 | ACE renal porcina | Sigma (A2580) |

1.3 Tampón de homogeneización 1

Manitol 100 mM y Tris 20 mM a pH 7,1

Se diluyen 2,42 g de Tris (Fisher T/P630/60) en 1 litro de agua y se ajusta el pH a 7,1 utilizando HCl 6 M a temperatura ambiente. Se añade a ésto 18,22 g de manitol (Sigma M-9546).

1.4 Tampón de homogeneización 2

Manitol 100 mM y Tris 20 mM a pH 7,1 y $MgCl_2.6H_2O$ 10 mM (Fisher M0600/53)

Se añaden a 500 ml del tampón de homogeneización 1 (1.4) 1,017 g de $MgCl_2$.

1.5 Tampón Tris (tampón ACE)

Tris 50 mM y NaCl 300 mM a pH 7,4

Se preparan 50 ml de Tris 50 mM pH 7,4 (Sigma T2663) y 17,52 g de NaCl (Fisher S/3160/60) en agua hasta un volumen de 1000 ml.

1.6 Sustrato (Abz-D-Gly-para-nitro-Phe-Pro-OH) (Bachem M-1100)

Se almacena el sustrato ACE en forma de polvo a -20°C. Se prepara una disolución madre 2 mM por resuspensión suave del sustrato en tampón ACE, no debe agitarse en Vortex ni sonicarse. Se almacenan alícuotas de 400 μl de disolución madre 2 mM a -20°C durante un periodo de hasta un mes.

1.7 Producto total

Se incluyen en la placa muestras correspondientes al 100% de conversión de producto a sustrato para posibilitar la determinación del % de rendimiento del sustrato (véanse cálculos). Se genera el producto total por incubación de 1 ml de sustrato 2 mM con 20 μl de disolución madre de enzima durante 24 horas a 37°C.

1.8 Disolución de parada.

Se diluye EDTA 0,5 M (Promega CAS [6081/92/6] 1:250 en tampón ACE para preparar una disolución 2 mM.

1.9 Dimetilsulfóxido (DMSO)

1.10 Cloruro de magnesio, $MgCl_2.6H_2O$ (Fisher M0600/53)

1.11 Placas de ensayo de fondo plano de 96 pocillos negras

2436

(Costar 3915 o Packard).

1.12 Topseal A (Packard 6005185).

1.13 Tubos de centrífuga

## 2. EQUIPAMIENTO ESPECIFICO

2.1 Centrífuga Sorvall RC-5B (rotor SS34 GSA, preenfriada a 4°C).

2.2 mezclador Miniprimer de Braun

2.3 Centrífuga Beckman CS-6R.

2.4 BMG Fluostar galaxy

2.5 Incubador de agitación Wesbart 1589.

## 3. PROCEDIMIENTOS

### 3.1 PREPARACION DE TEJIDOS

3.2 Se obtiene ACE humana de corteza renal utilizando un procedimiento adaptado de Booth, A.G. & Kenny, A.J. (1974) *Biochem J.*, 142, 575-581.

3.3 Se dejan descongelar los riñones congelados a temperatura ambiente y se extraen las cortezas de la médula.

3.4 Se corta finamente en láminas la corteza y se homogeneiza en aproximadamente 10 volúmenes de tampón de homogeneización 1 (1.4) utilizando un dispositivo

2437

Miniprimer de Braun (2.2).

3.5 Se añade cloruro de magnesio (1.1) (20,3 mg/g de tejido) al homogeneizado y se agita en baño de hielo y agua durante 15 minutos.

3.6 Se centrifuga el homogeneizado a 1.500 g (3.820 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman (2.3) antes de extraer el sobrenadante a un tubo de centrífuga nuevo y de descartar el sedimento.

3.7 Se centrifuga el sobrenadante a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Sorvall (2.1) y se descarta el sobrenadante.

3.8 Se extrae la capa rosa pálido de encima del sedimento restante y se resuspende en tampón de homogeneización 2 (1.5) (5 ml de tampón por 1 g de tejido).

3.9 Se centrifuga la suspensión a 2.200 g (4.630 rpm) durante 12 minutos en una centrífuga Beckman antes de descartar el sedimento.

3.10 Se centrifuga el sobrenadante a 15.000 g (12.100 rpm) durante 12 minutos utilizando la centrífuga Sorvall y se descarta el sobrenadante.

3.11 Se resuspende el sedimento final en tampón de homogeneización 2 (0,5 ml de tampón por 1 g de tejido). Se obtiene una suspensión homogénea utilizando Miniprimer de Braun. Esta se congela a continuación en alícuotas de 100 µl para ensayar la actividad NEP.

## 4.0 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ACE

Se mide la actividad de la ACE previamente dispuesta en alícuotas por su capacidad de cortar el sustrato peptídico específico de ACE.

Se descongela ACE porcina (1.2) y se resuspende en tampón ACE (1.6) a 0,004 U/μl, que se vuelve a congelar en alícuotas de 50 μl.

4.1 Se prepara una disolución de DMSO al 4%/tampón ACE (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón ACE).

4.2 Se dejan las disoluciones madre de sustrato (1.7), producto total (1.8) y enzima (1.1, 1.2 y 1.3) en hielo para descongelar.

4.3 Se añaden 50 μl de disolución de DMSO al 4%/tampón ACE a cada pocillo.

4.4 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:100 para preparar una disolución 20 μM. Se añaden 100 μl de sustrato 20 μM a cada pocillo (concentración final en el ensayo 10 μM).

4.5 Se añaden 50 μl de un intervalo de diluciones de enzimas para iniciar la reacción (habitualmente se utilizan 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200). Se añaden 50 μl de tampón ACE a los pocillos blanco.

4.6 Se diluye el producto total 2 mM 1:200 para preparar una disolución 10 μM. Se añaden 200 μl de producto 10 μM a los cuatro primeros pocillos de una placa nueva.

4.7 Se incuban las placas a 37°C en incubador de agitación durante 60 minutos.

4.8 Se para la reacción por adición de 100 μl de EDTA 2 mM en tampón ACE y se incuba a 37°C en un incubador de agitación durante 20 minutos antes de leer en un BMG Fluostar Galaxy (ex320, em420).

## 5. ENSAYOS DE INHIBICION DE ACE

5.1 Se dejan las disoluciones madre de sustrato, producto total y enzima en hielo para descongelar.

5.2 Se preparan disoluciones madre del compuesto con DMSO al 100% y se diluyen 1:25 en tampón ACE proporcionando una disolución de DMSO al 4%. Todas las demás diluciones se llevan a cabo en disolución de DMSO al 4% tampón ACE (4 ml de DMSO en 96 ml de tampón ACE).

5.3 Se añaden 50 μl de compuesto por duplicado a la placa de 96 pocillos y se añaden 50 μl de DMSO al 4%/tampón ACE a los pocillos de control y a los blancos.

5.4 Las etapas 5.2 y 5.3 pueden llevarse a cabo manualmente o utilizando robots multisonda de Packard.

5.5 Se diluye la disolución madre de sustrato 2 mM 1:100 en tampón ACE preparando una disolución 20 μM

2440

(concentración final 10 $\mu$M en el ensayo) (110 $\mu$l de sustrato 2 mM añadidos a 10,89 ml de tampón es suficiente para una placa).

5.6 Se diluye la disolución madre de enzima en tampón ACE, según lo determinen las comprobaciones de actividad (4.0).

5.7 Se diluye la disolución madre de producto total 2 mM 1:200 en tampón ACE para preparar una disolución 10 $\mu$M. Se añaden 200 $\mu$l a los cuatro primeros pocillos de una placa por separado.

5.8 Se diluye la disolución madre de EDTA 0,5 mM 1:250 para preparar una disolución madre 2 mM (44 $\mu$l de EDTA a 10,96 ml de tampón ACE).

5.9 Se añade a cada pocillo de la placa de 96 pocillos los siguientes reactivos:

Tabla 1: Reactivos añadidos a la placa de 96 pocillos.

| | Compuest /DMSO | Tampón Tris | Sustrato | Enzima ACE | Producto total |
|---|---|---|---|---|---|
| Muestras | 2 $\mu$l de compuesto | 50 $\mu$l | 100 $\mu$l | 50 $\mu$l | Nada |
| Controles | 2 $\mu$l de DMSO | 50 $\mu$l | 100 $\mu$l | 50 $\mu$l | Nada |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Blancos | 2 µl de DMSO | 100 µl | 100 µl | Nada | Nada |
| Totales | 2 µl de DMSO | Nada | Nada | Nada | 200 µl |

5.10 Se añaden 50 µl de la concentración mayor de cada compuesto utilizado en el ensayo por duplicado a la misma placa de 96 pocillos de los totales (5.7). Se añaden 150 µl de tampón ACE para determinar cualquier fluorescencia de un compuesto.

5.11 Se inicia la reacción por adición de la enzima ACE antes de incubar a 37°C durante 1 hora en un incubador de agitación.

5.12 Se para la reacción por adición de 100 µl de EDTA 2 mM y se incuba a 37°C durante 20 minutos en un incubador de agitación antes de leer en el BMG Fluostar Galaxy (ex320/em420).

## 6. CALCULOS

Se determina la actividad de la enzima ACE en presencia y ausencia del compuesto y se expresa como un porcentaje.

FU= unidades de fluorescencia

(i) % de actividad del control (rendimiento de la enzima)

$$\frac{\text{FU medias de los controles} - \text{FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales} - \text{FU medias de los blancos}} \times 100$$

(ii) % de actividad con inhibidor

$$\frac{\text{FU medias del compuesto} - \text{FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los totales} - \text{FU medias de los blancos}} \times 100$$

(iii) Actividad expresada como % del control:

$$\frac{\%\ \text{actividad con inhibidor}}{\%\ \text{actividad del control}} \times 100$$

o

$$\frac{\text{FU medias del compuesto} - \text{FU medias de los blancos}}{\text{FU medias de los controles} - \text{FU medias de los blancos}} \times 100$$

(iv) % inhibición = 100 - % control

(v) Para los compuestos fluorescentes las FU medias de los blancos que contienen compuesto (5.10) se deducen de las FU medias de los valores del compuesto utilizados para calcular el % de actividad.

2443

Se ajusta una curva de dosis-respuesta sigmoidal para el % de actividades (% de control) frente a la concentración de compuesto y se calculan los valores de CI50 utilizando el ajuste de curvas LabStats en Excel.

## CONCLUSIONES

Los presentes autores han desarrollado un modelo animal que refleja la respuesta de excitación fisiológica obervada durante la excitación sexual femenina y que refleja directamente los datos clínicos obtenidos en voluntarias humanas. El modelo utiliza tecnologías de láser Doppler para registrar pequeños cambios en el flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo inducidos por la estimulación del nervio pélvico o por neurotransmisores vasoactivos. Durante la excitación sexual, existe un aumento del flujo sanguíneo genital resultante del aumento de inervación del nervio pélvico. El aumento estimulado por el nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo observado en el modelo animal representa los efectos vasculares endógenos observados durante la excitación sexual femenina, es decir la congestión. Por lo tanto, este modelo puede utilizarse en primer lugar para identificar los mecanismos implicados en la regulación del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo y, en segundo lugar, para validar nuevos enfoques para la estimulación del flujo sanguíneo genital.

Este estudio ha utilizado exitosamente una combinación de técnicas in vivo, in vitro y bioquímicas para mostrar que el VIP media el flujo sanguíneo genital y para identificar al cAMP como el mediador/segundo mensajero que regula la vasorrelajación genital (y la relajación de la pared vaginal). Utilizando estte modelo animal, se ha demostrado que la infusión de VIP induce aumentos del flujo sanguíneo vaginal y clitorídeo. Utilizando un inhibidor del metabolismo de VIP (por ejemplo un inhibidor NEP EC3.4.24.11) hemos demostrado también que los aumentos del flujo sanguíneo genital observados durante la estimulación del nervio pélvico (es decir excitación sexual) están mediados por el VIP. Se ha mostrado que los aumentos mediados por el VIP en el flujo sanguíneo genital resultan de la elevación de los niveles de cAMP de tejido, mientras que anteriormente se había mostrado que el VIP aumentaba el flujo sanguíneo vaginal en voluntarias sanas, pero el mecanismo celular no estaba identificado. Además, se ha demostrado que el flujo sanguíneo genital puede estimularse directamente con un mimético de cAMP o indirectemente elevando las concentraciones de cAMP con un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 o con un antagonista de receptor de NPY Y1.

2445

La causa principal de FSAD es una reducción del flujo sanguíneo genital y esta se manifiesta como una reducción de la congestión vaginal, labial y clitorídea. El tratamiento de mujeres con FSAD es factible restableciendo la respuesta de excitación sexual normal. Esto puede conseguirse estimulando el flujo sanguíneo genital. El enfoque de los presentes autores para el tratamiento de FSAD será estimular el flujo sanguíneo genital potenciando así la congestión/lubricación vaginal y la congestión/sensibilidad clitorídea por potenciación directa o indirecta de la señalización de cAMP endógeno, por ejemplo con un inhibidor de NEP (EC 3.4.24.11), un inhibidor de PDE hidrolizante de cAMP o un antagonista del receptor de NPY. Esto tendrá el efecto genérico de restablecer o potenciar la respuesta de excitación normal sin efectos secundarios cardiovasculares. Se potenciará la excitación sexual/congestión, más que inducirla simplemente en ausencia de estímulo sexual, que puede ser el caso con algunos agentes vasoactivos administrados exógenamente, por ejemplo el VIP.

En resumen, por lo tanto, la presente invención se refiere, entre otras cosas, a:

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se

2446

utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD.

Un procedimiento de tratamiento de una hembra (como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una realización altamente preferida, la presente invención se refiere a, entre otras cosas:

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo suministrado oralmente el citado agente.

El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, y siendo suministrado oralmente el citado agente.

Un procedimiento de tratamiento de una hembra (tal como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y siendo suministrado oralmente el citado agente.

En una realización adicional altamente preferida, la presente invención se refiere, entre otras cosas, a:

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

Un procedimiento de tratamiento de una hembra (tal como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

En otra realización altamente preferida, la presente invención se refiere, entre otras cosas, a:

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, siendo suministrado oralmente el citado agente y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, siendo suministrado oralmente el citado agente y potenciando el citado agente el cAMP

2450

endógeno.

Un procedimiento de tratamiento de una hembra (tal como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, estando suministrado oralmente el citado agente y potenciando el citado agente el cAMP endógeno.

Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan a la presente como referencia. Diversas modificaciones y variaciones de los procedimientos y del sistema descritos en la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin salirse del alcance y espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención se describe en conexión con realizaciones preferidas específicas, debe comprenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. Es más, están previstas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en bioquímica y biotecnología o campos relacionados, dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

## REFERENCIAS DEL TEXTO GENERAL

Ashur-Fabian, O., Perl. O., Lilling. G., et al., (1999) SNV, a lipophilic superactive VIP analogue, acts through cGMP to promote neuronal survival. *Peptides*, **20**, 629-633.

Berman, J.R., Berman, L. & Goldstein, I. (1999). Female sexual dysfunction: Incidence, pathophysiology, evaluation and treatment options. *Urology*, **54**, 385-391.

Berman, J., Goldstein, I., Werbin, T. et al., (1999a). Double blind placebo controlled study with crossover to assess effect of sildenafil on physiological parameters of the females sexual response. *J. Urol.*, **161**, 805.

Burnett, A., Calvin, D., Silver, R., et al., (1997). Immunohistochemical description of nitric oxide sinythase isoforms in human clitoris. *J. Urol.*, **158**, 75-78.

*Diagnostic and statistical manual of mental disorders-IV*, American Psychiatric Association, Washington DC. 1987, pág.

493-518.

Fan, Y.P., Chakder, S. & Ratton, S. (1999). Inhibitory effect of zinc protoporhyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal polypeptide and other receptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 468-474.

Foda, H.D., Sharaf, H.H., Absood, A. et al. (1995). Pituitary adenilate cyclase-activating peptide (PACAP), a VIP-like peptide, has prolonged airway smooth muscle relaxant activity. *Peptides*, **16**, 1057-1061.

Frank, E., Anderson, C. & Rubinstein, D. (1978). Frequency of sexual dysfunction in "normal" couples. *N. Engl. J. Med.*, **229**, 111-115.

Goldstein, I. & Berman, J.R: (1998). Vasculogenic female sexual dysfunction: vaginal engorgement and clitoral erectile insufficiency syndromes. *Int. J. Impot. Res.*, **10**, S84-S90.

Gu, Z.F., Jensen, R.T. & Matton, P.N. (1992). A primary role for protein kinase A in smooth muscle relaxation induced by adrenergic agonists and neuropeptides. *Am. J.*

2453

*Physiol.*, **263**, G360-G364.

Hauser-Kronberger, C., Cheung, A., Hacker, G. et al. (1999). Peptidergic innervation of the human clitoris. *Peptides*, **20**, 539-543.

Hoyle, C.H.V., Stones, R.W., Robson, T. et al. (1996). Innervation of vasculature and microvasculature of the human vagina by NOS and neuropeptide containing nerves. *J. Anat.*, **188**, 633-644.

Ingenhoven, N. & Beck-Sickinger, A.G. (1997). Fluorescent labelled analogues of neuropeptide Y for the characterisation of cells expressing NPY receptor subtypes. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, **17**, 407-418.

Jovanovic, A., Jovanovic, S., Tulic, I. et al (1998). Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by vasoactive intestinal polypeptide in human uterine artery. *Mol. Human. Reprod.*, **4**, 71-76.

Kaplan, H.S. (1974). The New Sex Therapy. Londres. Bailliere Tindall.

Kaplan, S.A., Reis, R.B., Kohm, I.J. et al. (1999). Safety and efficacy of sildenafil in postmenopausal women with sexual dysfunction. *Urology*, 53, 481-486.

Kim, Y.C., Choi, H.K., Ahn, Y.S., et al. (1994). The effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on rabbit cavernosal smooth muscle contractility. *J. Androl.*, 15, 392-739.

Laan, E. & Everaerd, W. (1988). Physiological measures of vaginal vasocongestion. *Int. J. Impot. Res.*, 10, S107-S110.

Leiblum, S.R. (1998). Definition and classification of female sexual disorders. *Int. J. Impotence Res.*, 10, S104-S106.

Levin, R.J. (1980). The physiology of sexual function in women. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 7, 213-252.

Levin, R.J. (1991). VIP, vagina, clitoral and preurethral glans: An update on female genital arousal. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 98, 61-69.

Levin, R.J. (1992). The mechanisms of human females sexual arousal. *Ann. Rev. Sex. Res.*, 3, 1-48.

2455

Levin, R.J. & Wagner, G. (1986). TRH and vaginal blood flow-effects in conscious women and anaesthetised sheep. *J. Physiol.*, 373, 83p.

Lunberg, J.M., Modin, A. & Malmstrom, R.E. (1996), Recent developments with neuropeptide Y receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17, 301-304.

Masters, W.H., Johnson, V.E. *Human Sexual Response*, Little, Brown: Boston, 1996.

Ottesen, B., Gerstenberg, T., Ulrichsen, H. et al. (1983). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases vaginal blood flow and inhibits smooth muscle activity in women. *Eur. J. Clin. Invest.*, 13, 321-324.

Ottesen, B., Wagner, G. & Fahrenkrug, J. *Peptide innervation of the sexual organs*. En: Handbook of Sexology, vol. 6, The Pharmacological and Endocrinology of Sexual Function, Sitsen, J.M.A. (ed). Amsterdam: Elsevier Science Publishers (1988), capítulo 4, pág. 66-97.

Ottensen, B., Pedersen, B., Nielsen, J. et al. (1987). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) provokes vaginal lubrication in normal women. *Peptides*, 8, 797-800.

2456

Park, K., Goldstein, I., Andry, C., et al (1997). Vasculogenic female sexual dysfunction: The hemodynamic basis for vaginal engorgement insufficiency and clitoral erectile insufficiency, *Int. J. Impotence Res.*, 9, 27-37

Rosen, R., Taylor, J., Leiblum, S. *et al*. (1993). Prevalence of sexual dysfunction in women: results of a survey of 329 women in an outpatient gynecological clinic. *J. Sex. Marital Ther.*, 19, 171-188.

Schiavi, R.C. & Seagraves, R.T. (1995). The biology of sexual function. *Psychiat. Clin. North. Am.*, 18, 7-23.

Schoeffter, P. & Stoclet, J.C. (1985). Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on cyclic AMP level and relaxation in rat isolated aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 109, 275-279.

Serradeil-Le Gal, C., Valette, G. Rouby, P.E. et al. (1995). SR 120819A, an orally active and selective neuropeptide Y Y1 receptor antagonist. *FEBS Letters*, 3, 192-196.

Sjoberg, I. (1992). The vagina: Morphological, functional and ecological aspects. *Acta Obst. Gynecol. Scand.*, 71, 84-

85.

Spector, I.P. & Carey, M.P. (1990). Incidence and prevalence of sexual dysfunctions: a critical review of empirical literature. *Arch. Sex. Behav.*, **19**, 389-408.

Wagner, G. (1992). Aspects of genital physiology and pathology. *Sem. Neurol.*, **12**, 87-97.

Werbin, T., Salimpour, P., Berman, L, et al (1999). Effect of sexual stimulation and age on genital blood flow in women with sexual stimulation. *J. Urol.*, **161**, 688.

Wincze, J.P., Albert, A. & Bansal, S. (1993). Sexual arousal in diabetic females: Physiological and self-report measures. *Arch. Sex Behav.*, **22**, 587-601.

Wieland, H.A., Willim, K.D., Entzeroth, M. et al (1995). Subtype selectivity and antagonist profile of nonpeptide Y1 receptor antagonist BIBP 3226. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 143-9.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION PDE

1. Han, P., Fletcher, C.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A.,

2458

Yaremko, L.M., Michaeli, T. Assignemt of the mouse Pde7A gene to the proximal region of chromosome 3 and of the human PDE7A gene to chromosome 8q13. Genomics 48: 275-276, 1998.

2. Michaeli, T., Bloom, T.J., Martins. T., Loughney, K., Ferguson, K., Riggs, M., Rodgers, L. Beavo, J.A., Wigler, M.: Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phophodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem., 268: 12925-12932, 1993.

3. Milatovich, A., Bolger, G., Michaeli, T., Francke, U.: Chromosome localization of genes for five cAMP-specific phosphodiesterases in man and mouse. Somat. Cell. Molec. Genet. 20:75-86, 1994.

4. Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K., Loughney, K.: Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3-prime, 5-prime-cyclic nucleotide phophodiesterase. Gene 191: 89-95, 1997.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NEP

1. Barker, P.E., Shipp, M.A., D'Adamio, L., Masteller, E.L., Reinherz, E.L. The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3(q21-q27). J. Immun. 142:283-287, 1989.

2. D'Adamio, L., Shipp, M.A., Masteller, E.L.; Reinherz, E.L.: Organization of the gene encoding common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 24.11): multiple miniexons and separate 5-prime untranslated regions. Proc. Nat. Acad. Sci. 86:7103-7107, 1989.

3. Letarte, M., Vera, S., Tran, R., Addis, J.B.L., Onizuka, R.J., Quackenbush, E.J., Jongeneel, C.V., McInnes, R.R:: Common acute lymphocytic leukemia antigen is identical to neutral endopeptidase. J. Exp. Med. 168:1247-1253, 1988.

4. Shipp, M.A., Vijayaraghavan, J., Schmidt, E.V., Masteller, E.L., D'Adamio, L., Hersh, L.B., Reinherz, E.L.: Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 ("enkephalinase"): direct evidence by cDNA transfection analysis. Proc. Nat. Acad. Sci. 86:297-301, 1989.

5. Tran-Paterson, R., Willard, H.F., Letarte, M.: The

2460

common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase 3.4.24.11) gene is located on human cromosome 3. Cancer Genet. Cytogenet 42:129-134, 1989.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPY

1. Allen, J.M., Bloom, S.R.: Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8:1-8, 1986.

2. Bahary, N., Zorich, G., Pachter, J.E., Leibel, R.L., Friedman, J.M.: Molecular genetic linkage maps of mouse chromosomes 4 and 6. Genomics 11:33-47, 1991.

3. Baker, E., Hort, Y.J., Ball, H., Sutherland, G.R., Shine, J., Herzog, H.: Assignment of the human neuropeptide Y gene to chromosome 7p15.1 by nonisotopic in situ hybridization. Genomics 26:163-164, 1995.

5. Carr, L.G., Foroud, T., Bice, P., Gobbert, T., Ivashina, J., Edenberg, H., Lumeng. L., Li, T.K.: A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines. Alcohol Clin. Exp. Res. 22:884-887, 1998.

5. Dockray, G.J.: Neuropeptide Y: in search of a function. Neurochem. Int. 8:9-11, 1986.

6. Erickson, J.C., Clegg., K.E., Palmiter, R.D.: Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. Nature 381: 415-421, 1996. PubMed ID: 8632796.

7. Erickson, J.C., Hollopeter, G., Palmiter, R.D.: Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. Science 274: 1704-1706, 1996.

8. Karvonen, M.K., Pesonen, U., Koulu, M., Niskanen, L., Laakso, M., Rissanen, A., Dekker, J.M., t'Hart, L.M., Valve, R., Uusitupa, M.I.: Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. Nature Med. 4:1434-1437, 1998.

9. Maccarrone, C., Jarrott., B.; Neuropeptide Y: a putative neurotransmitter. Neurochem. Int. 8:13-22, 1986.

10. Meisler, M.H., Spence, J.E., Dixon, J.E., Caldwell, R.M., Minth, C.D., Beaudet, A.L.: Exclusion of close linkage between the loci for cystic fibrosis and neuropeptide Y on human cromosome 7. Cytogenet. Cell Genet. 44:175-176, 1987.

2462

11. Minth, C.D., Andrews, P.C., Dixon, J.E.: Characterization, sequence and expression of the cloned human neuropeptide Y gene. J. Biol. Chem. 261:11974-11979, 1986.

12. Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M., Dixon, J.E.: Cloning, characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptidase tyrosine. Proc. Nat. Acad. Sci. 81:4577-4581, 1984.

13. Takeuchi, T., Gumucio, D., Eddy, R., Meisler, M., Minth, C. Dixon, J., Yamada, T., Shows, T.: Assignment of the related pancreatic polypeptide (PPY) and neuropeptide Y (NPY) genes to regions on human chromosomes 17 and 7. (Resumen) Cytogenet. Cell. Genet. 40:759 sólo, 1985.

14. Takeuchi, T., Gumucio, D.L., Yamada, T., Meisler, M.H., Minth, C.D., Dixon, J.E., Eddy, R.E., Shows, T.B.: Genes encoding pancreatic polypeptide and neuropeptide Y are on human chromosomes 17 and 7. J. Clin. Invest. 77:1038-1041, 1986.

15. Terenghi, G., Polak, J.M., Hamid, Q., O'Brien, E., Denny, P., Legon, S., Dixon, J., Minth, C.D., Palay, S.L., Yasargil, G., Chan-Palay, V.: Localization of neuropeptide

2463

Y mRNA in neurons of human cerebral cortex by means of in situ hybridization with a complementary RNA probe. Proc. Nat. Acad. Sci. 84:7315-7318, 1987.

16. Thiele, T.E., Marsh, D.J., Ste. Marie, L., Bernstein, O.L., Palmiter, R.D.: Ethanol consumption and resistance are inversely related to neuropeptide Y levels. Nature 396:366-369, 1998.

17. Uusitupa, M.I.J., Karvonen, M.K., Pesonen, U., Koulu, M.: Neuropeptide Y: a novel link between the neuroendocrine system and cholesterol metabolism. Ann. Med..30:508-510, 1998.

REFERENCIAS PARA LA SECCION NPYR1

1. Herzog, H., Baumgartner, M., Vivero, C., Selbie, L.A., Auer, B., Shine, J.: Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human neuropeptide Y Y1 receptor. J. Biol. Chem. 268:6703-6707, 1993.

2. Herzog, H., Darby, K., Ball, H., Hort, Y., Beck-Sickinger, A., Shine, J.: Overlapping gene stucture of the human neuropeptide Y receptor subtypes Y1 and Y5 suggests

coordinate transcriptional regulation, Genomics 41:315-319, 1997.

3. Herzog, H., Hort, Y.J., Ball, H.J., Hayes, G., Shine, J., Selbie, L.A.: Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. Proc. Nat. Acad. Sci. 89:5974-5798, 1992.

4. Larhammar, D., Blomqvist, A.G., Yee, F., Jazin, E., Yoo, H., Whalestedt, C.: Cloning and functional expression of a human neuropeptide Y/peptide YY receptor of the Y1 type. J. Biol. Chem. 267:10935-10938, 1992.

5. Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson, D.A.: Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41:498-500, 1997.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION NPYR2

1. Ammar, D.A., Eadie, D.M., Wong, D.J., Ma, Y.-Y., Kolakowski, L.F. Jr., Yang-Feng, T.L., Thompson, D.A.: Characterization of the human type 2 neuropeptide Y receptor gene (NPY2R) and localization to the chromosome 4q region containing the type 1 neuropeptide Y receptor

gene. Genomics 38:392-398, 1996.

2. Gerald, C., Walker, M.W:, Vaysse, P., J.-J., He, C., Brancheck, T.A., Weinsahnk, R.L.: Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype. J. Biol. Chem. 270: 26758-26761, 1995.

3. Lutz, C.M., Frankel, W.N., Richards, J.E., Thompson, D.A.: Neuropeptide Y receptor genes on human chromosome 4q31-q32 map to conserved linkage groups on mouse chromosomes 3 and 8. Genomics 41: 498-500, 1997.

4. Rose, P.M., Fernandes, P., Lynch, J.S., Frazier, S.T., Fisher, S.M., Kodukula, K., Kienzle, B., Seethala, R.: Cloning and functional expression of a cDNA encoding a human type 2 neuropeptide Y receptor. J. Biol. Chem. 270:22661-22664, 1995.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VIP

1. Bodner, M., Fridkin, M. Gozes, I.: Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Nat. Acad. Sci. 82: 3548-3551, 1985.

2466

2. Gotoh, E., Yamagami, T., Yamamoto, H., Okamoto, H.: Chromosomal assignment of human VIP/PHM-27 gene to 6q26-q27 region by spot blot hybridization and in situ hybridization. Biochem. Int. 17:555-562, 1988.

3. Gozes, I., Avidor, R., Yahav, Y., Katznelson, D. Croce, C.M., Huebner, K.: The gene encoding vasoactive intestinal peptide is located on human chromosome 6p21-6qter. Hum. Genet. 75:41-44, 1987.

4. Gozes, I., Nakai, H., Byers, M., Avidor, R., Weinstein, Y., Shani, Y., Shows, T.B.: Sequential expression in the nervous system of C-MYB and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24. Somat. Cell. Molec. Genet. 13:305-313, 1987.

5. Heinz-Erian, P., Dey. R.D., Flux, M. Said, S.I.: Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in sweat glands of cystic fibrosis patients. Science 229: 1407-1408, 1985.

6. Itoh, N., Obata, K., Yanaihara, N., Okamoto, H.: Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature 304:547-549, 1983.

7. Linder, S., Barkhem, T., Norberg, A., Persson, H., Schalling, M., Hokfelt, T., Magnusson, G.: Structure and expression of the gene encoding the vasoactive intestinal peptide precursor. Proc. Nat. Acad. Sci. 84:605-609, 1987.

8. Omary, M.B., Kagnoff, M.F.: Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line. Science 238: 1578-1581, 1987.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION AC

1. Parma, J., Stengel, D., Gannage, M.-H., Poyard, M., Barouki, R., Hanoune, J.: Sequence of a human brain adenylyl cyclase partial cDNA: evidence for a consensus cyclase domain. Biochem. Biophys. Rs. Commun. 179:455-462, 1991.

2. Stengel, D., Parma, J., Gannage, M.-H., Roeckel, N., Mattei, M.-G., Barouki, R., Hanoune, J.: Different chromosomal localization of two adenylyl cyclase genes expressed in human brain. Hum. Genet. 90:126-130, 1992.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VPAC1

1. Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., Darmoul, D., Maoret,

J.-J., Carrero, I., Ogier-Denis, E., Laburthe, M.: Human intestinal VIP receptor: cloning and functional expression of two cDNS encoding proteins with different N-terminal domains. Biochem. Biopys. Res. Commun. 200:769-776, 1994.

2. Hashimoto, H., Nishino, A., Shintani, N., Hagihara, N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Yamamoto, K., Matsuda, T., Ishihara, T., Nagata, S., Baba, A.: Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VPAC-1) receptor. Genomics 58:90-93, 1999.

3. Libert, F., Passage, E., Parmentier, M., Simons, M.-J., Vassart, G., Mattei, M.-G., Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonine receptor. Genomics 11: 225-227, 1991.

4. Sreedharan, S.P., Huang, J.-X., Cheung, M.-C., Goetzl, E.J.: Structure, expression and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. Proc. Nat. Acad. Sci. 92:2939-2943, 1995.

5. Sreedharan, S.P., Patel, D.R., Huang, J.-X., Goetzl, E.J.: Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 193:546-553, 1993.

6. Sreedharan, S.P., Robichon, A., Peterson, K.E., Goetzl, E.J.: Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. 88:4986-4990, 1991.

7. Vassart, G.: Personal Communication. Bruselas, Bélgica, 1-15-1992.

8. Wenger, G.D.: Personal Communication, Columbus, Ohio, 8-3-1993.

## REFERENCIAS PARA LA SECCION VPAC2

1. Adamou, J.E., Aiyar, N., Van Horn, S., Elshourbagy, N.A.: Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 209:385-392, 1995.

2. MacKay, M., Fantes, J., Scherer, S., Boyle, S., West, K., Tsui, L.-C., Belloni, E., Lutz, E., Van Heyningen, V., Harmar, A.J.: Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. Genomics 37:345-353, 1996.

3. Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., Goosens, J.-F., De Neef, P., Waelbroeck, M. Robberecht, P.: Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. Biochem. Biophy. Res. Commun. 205:1617-1624, 1994.

ABREVIATURAS

FSD = disfunción sexual femenina
FSAD = trastorno de la excitación sexual femenina

cAMP = 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
cGMP = 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico

$P_{cAMP}$ = potenciador de cAMP
$P_{cGMP}$ = potenciador de cGMP

$A_{cAMP}$ = activador de cAMP
$A_{cGMP}$ = activador de cGMP

$AM_{cAMP}$ = modulador adverso de cAMP
$AM_{cGMP}$ = modulador adverso de cGMP

$I_{cAMP}$ = inhibidor de cAMP
$I_{cGMP}$ = inhibidor de cGMP

$I{:}I_{cAMP}$ = inhibidor de un inhibidor de cAMP
$I{:}I_{cGMP}$ = inhibidor de un inhibidor de cGMP
$I{:}AM_{cAMP}$ = inhibidor de un modulador adverso de cAMP
$I{:}AM_{cGMP}$ = inhibidor de un modulador adverso de cGMP
$U{:}A_{cAMP}$ = sobrerregulador de un activador de cAMP
$U{:}A_{cGMP}$ = sobrerregulador de un activador de cGMP

AC = adenilato ciclasa
A:AC = activador de AC

NEP = endopeptidasa neutra
I:NEP = inhibidor de NEP

VIP = péptido intestinal vasoactivo
VIPr = receptor de VIP (puede expresarse como VIPR)
$VIP_n$ = receptor de un subtipo de VIP (tal como VIPR1, VIPR2)
A:VIPr = activador de VIPr
$A{:}VIP_n$ = activador de $VIP_n$
I:VIPr = inhibidor de VIPr
$I{:}VIP_n$ = inhibidor de $VIP_n$
I:I:VIPr = inhibidor de un inhibidor de VIPr
$I{:}I{:}VIP_n$ = inhibidor de un inhibidor de $VIP_n$

PDE = fosfodiesterasa

2073
2472

PDEn = familia de las PDE (por ejemplo PDE1, PDE2, etc.)
$PDE_{cAMP}$ = PDE hidrolizante de cAMP
$PDE_{cGMP}$ = PDE hidrolizante de cGMP
I:PDE = inhibidor de una PDE
$I:PDE_{cAMP}$ = inhibidor de una PDE hidrolizante de cAMP
$I:PDE_{cAMP}$ = inhibidor de una familia de PDE hidrolizante de cAMP

NPY = neuropéptido Y
NPYr = receptor de NPY (puede expresarse como NPYR)
NPY $Y_n$ = subtipo de receptor $Y_n$ de NPY (por ejemplo NPY $Y_1$) (por ejemplo NPYR1)
I:NPY = inhibidor de NPY
I:NPY $Y_n$ = inhibidor de NPY $Y_n$

kDa = kilodalton
pb = par de bases
kb = kilopar de bases

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; y siendo el citado agente un inhibidor de PDE (I:PDE), siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el agente es un mediador de la vasorrelajación genital (por ejemplo vaginal o clitorídea).

3. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la composición es para administración oral.

4. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el citado cAMP es cAMP endógeno.

5. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición se administra antes o durante la estimulación sexual.

6. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo el agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

7. El uso según la reivindicación 6, en el que el agente es un mediador de la vasorrelajación genital (por ejemplo vaginal o clitorídea).

8. El uso según las reivindicaciones 6 ó 7, en el que el medicamento es para administración oral.

9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el citado cAMP es cAMP endógeno.

10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que la composición se administra antes o durante la estimulación sexual.

11. Un procedimiento de tratamiento de una hembra (tal como una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD), comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente

aceptable; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

12. Un procedimiento según la reivindicación 11 en el que el agente es un mediador de la vasorrelajación genital (por ejemplo vaginal o clitorídea).

13. Un procedimiento según las reivindicaciones 11 ó 12, en el que el agente se administra oralmente.

14. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el citado cAMP es cAMP endógeno.

15. Una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en la que la composición se administra antes o durante la estimulación sexual.

16. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede utilizarse para tratar la FSD, en particular el FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: determinar si un agente puede potenciar directa o indirectamente el cAMP, siendo la potenciación de cAMP en presencia del agente indicativa de que el agente puede ser útil en el tratamiento de la FSD, en particular del FSAD; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

17. Un procedimiento que comprende las etapas de:

(a) realizar el ensayo según la reivindicación 16.

(b) identificar uno o más agentes que pueden potenciar directa o indirectamente el cAMP, y

(c) preparar una cantidad de uno o más de esos agentes identificados;

y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

18. Un procedimiento de tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, por potenciación de cAMP in vivo con un agente,

siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente el cAMP en un procedimiento de ensayo in vitro,

siendo el procedimiento de ensayo in vitro el procedimiento de ensayo definido en la reivindicación 16;

y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

2477

19. El uso de un agente en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, siendo capaz el agente de potenciar directa o indirectamente el cAMP cuando se ensaya in vitro mediante un procedimiento de ensayo según la reivindicación 16; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

20. Un agente identificado por el procedimiento de ensayo según la reivindicación 16; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

21. Un agente según la reivindicación 20 para uso en medicina; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo el citado PDE un PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

22. Un agente según la reivindicación 21 para uso en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

23. Un medicamento de administración oral para tratar la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el medicamento el agente según la reivindicación 20; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante

de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

24. Un procedimiento de diagnóstico, comprendiendo el procedimiento aislar una muestra de una hembra, determinar si la muestra contiene una entidad presente en una cantidad tal que produzca FSD, preferiblemente FSAD, o si está en una cantidad como para producir FSD, preferiblemente FSAD, teniendo la entidad un efecto directo o indirecto sobre el nivel o la actividad de cAMP en los genitales sexuales de la hembra; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

25. Una composición o estuche de diagnóstico que comprende medios para detectar una entidad en una muestra aislada de una hembra, pudiendo utilizarse los medios para determinar si la muestra contiene la entidad presente en una cantidad tal que produzca FSD, preferiblemente FSAD, o si está en una cantidad como para producir FSD, preferiblemente FSAD, teniendo la entidad un efecto directo o indirecto sobre el nivel o la actividad del cAMP en los genitales sexuales de la hembra; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

26. Un modelo animal utilizado para identificar agentes capaces de tratar la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el citado modelo un animal hembra anestesiado, incluyendo los medios para medir los cambios del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o

clitorídeo) del citado animal a continuación de la estimulación del nervio pélvico de éste; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

27. Un procedimiento de ensayo para identificar un agente que puede potenciar directa o indirectamente el cAMP para tratar la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el procedimiento de ensayo: administrar un agente al modelo animal de la reivindicación 26, y medir cualquier potenciación de cAMP y/o aumento del flujo sanguíneo genital (por ejemplo vaginal o clitorídeo) del citado animal; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

28. Un agente identificado por el procedimiento de ensayo de la reivindicación 27; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

29. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

2480

2467

30. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para el tratamiento de FSD, preferiblemente FSAD; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

31. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

32. Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en la estimulación del flujo sanguíneo genital (vaginal o clitorídeo) femenino, comprendiendo la composición farmacéutica un agente, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; y siendo el citado agente un I:PDE, siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

33. El uso de un agente en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para estimular el flujo sanguíneo genital (vaginal o clitorídeo) femenino; y siendo el citado agente un I:PDE,

siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

34. Un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD (preferiblemente FSAD) o de prevención de FSD (preferiblemente FSAD), en la misma, comprendiendo el procedimiento suministrar a la hembra un agente; y siendo la citada agente una I:PDE, siendo el citado PDE un PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

35. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones 29 a 34, en la que el citado agente potencia el cAMP.

36. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo el citado cAMP, cAMP endógeno (como se ha definido en la presente).

37. La invención según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo el citado agente un I:PDE1 o I:PDE2 o I:PDE3 o I:PDE4 o I:PDE& o I:PDE8.

38. La invención según la reivindicación 37, en la que el citado agente es un I:PDE2.

## RESUMEN

Se describe un procedimiento de tratamiento de una hembra que sufre FSD, en particular FSAD. El procedimiento comprende suministrar a la hembra un agente que es capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales, estando el agente en una cantidad tal que produce la potenciación del cAMP en los genitales sexuales de la hembra. El agente puede mezclarse con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. El citado agente es un I:NEP.

Figura 1

Flujo sanguíneo genital. Relación de respuesta a la frecuencia entre la estimulación del nervio pélvico y el flujo sanguíneo

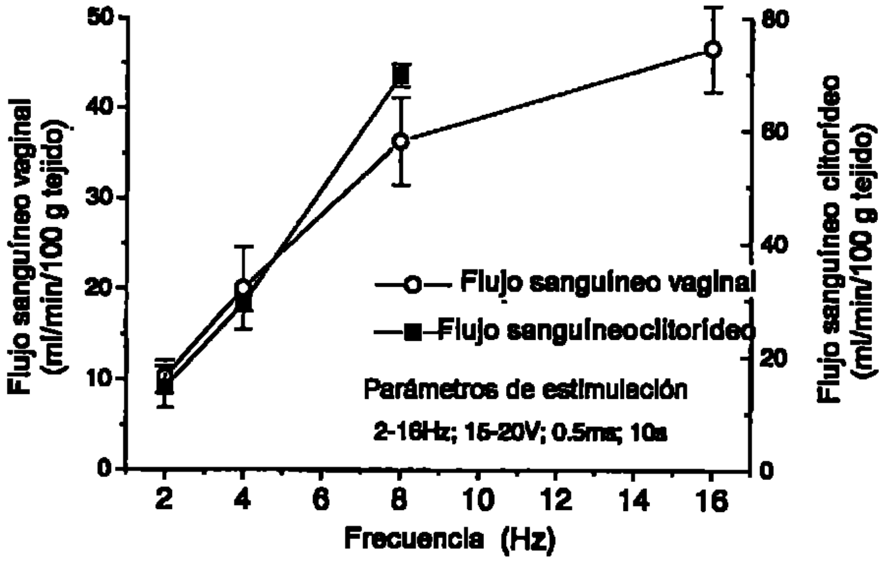
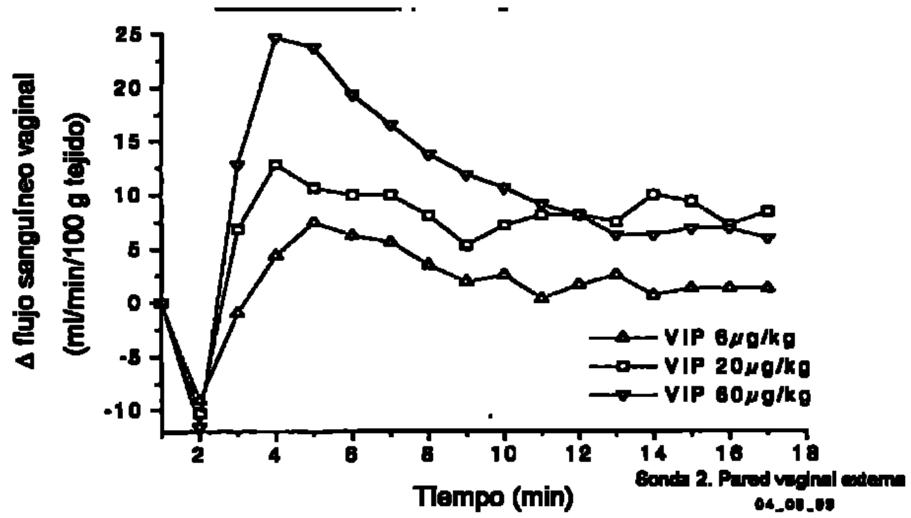


Figura 2

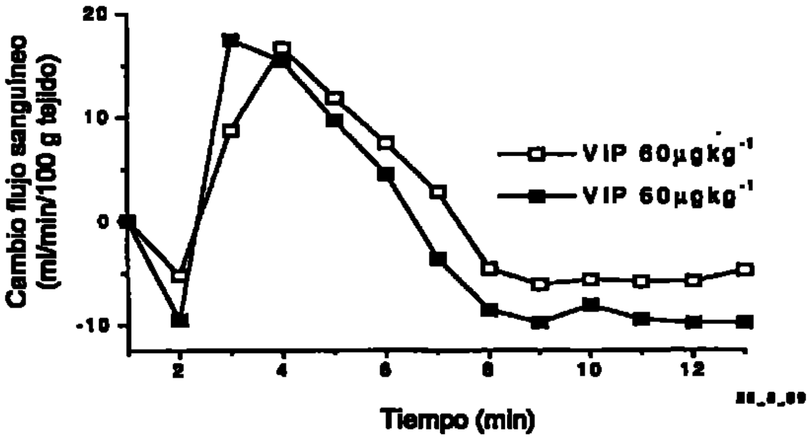
Efecto de VIP en el flujo sanguíneo vaginal

a



Efectos de infusiones repetidas de VIP sobre el flujo sanguíneo vaginal

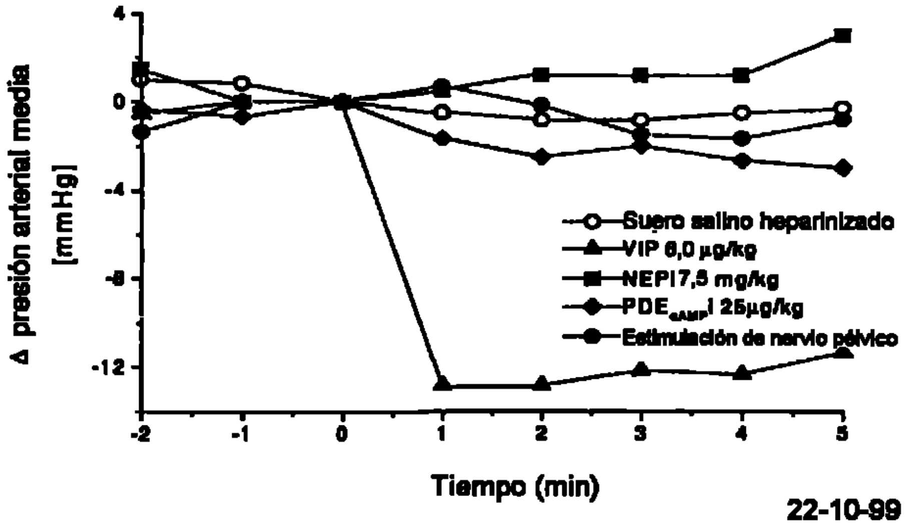
b



2b

Figura 3

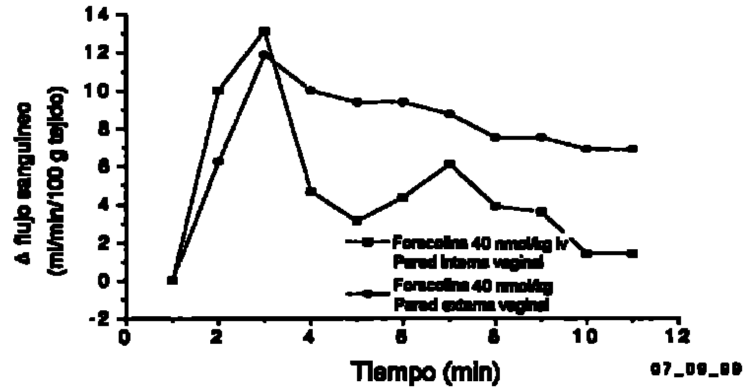
Efecto de VIP, de un inhibidor de NEP, de un inhibidor de PDE$_{cAMP}$ o de la estimulación del nervio pélvico sobre la presión arterial media en conejo anestesiado



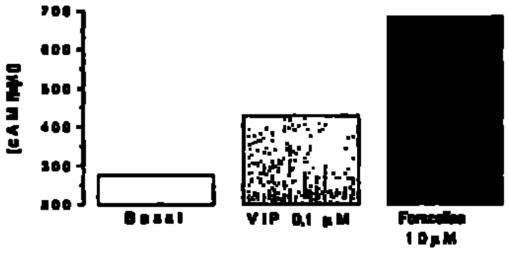
22-10-99

## Figura 4

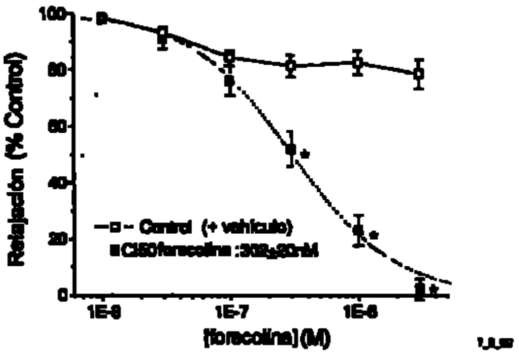
4a) La forscolina (un mimético de cAMP) aumenta el flujo sanguíneo vaginal en conejo anestesiado



4b) VIP estimula la producción de cAMP en vagina de conejo aislada



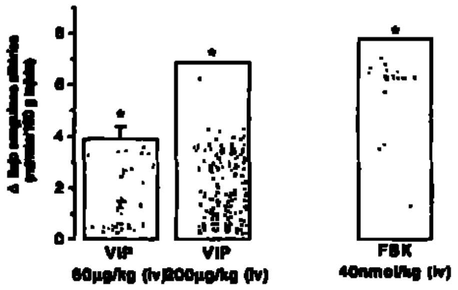
4c) Efecto relajante de la forscolina (un mimético de cAMP) sobre vagina de conejo aislada



2487

Figura 5

VIP y forscolina (un mimético de cAMP) aumentan el flujo sanguíneo clitorídeo en conejo anestesiado



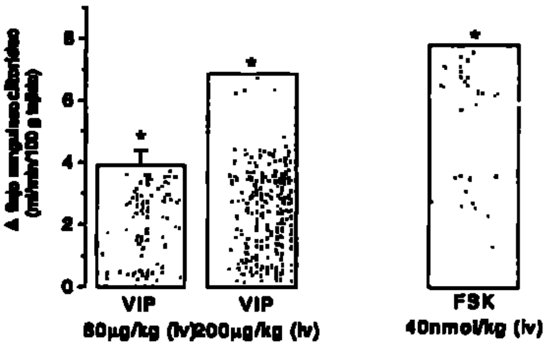
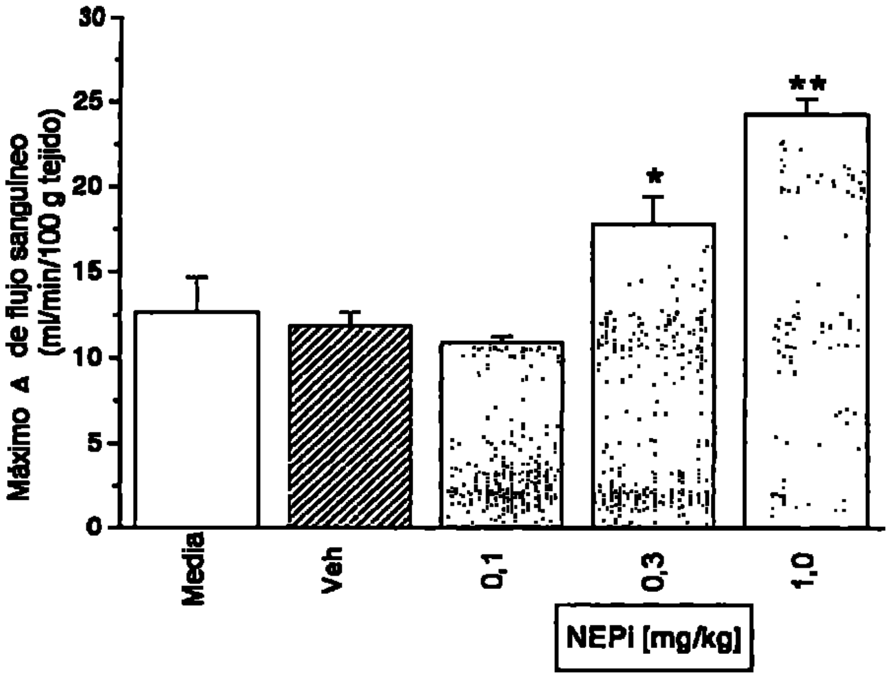


Figura 6

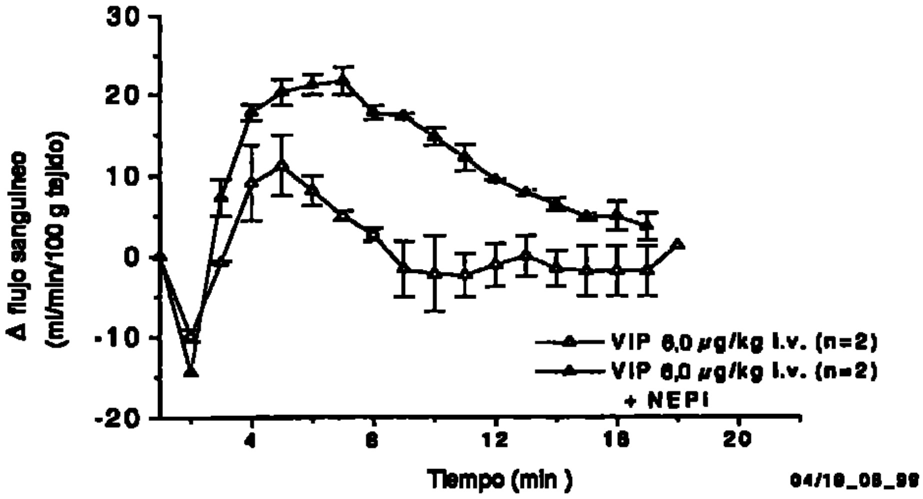
Efecto de un inhibidor de NEP sobre los cambios por estimulación del nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal de conejo anestesiado



2489

Figura 7

Efecto de VIP (6 µg/kg) sobre el flujo sanguíneo vaginal en presencia y ausencia de un inhibidor de NEP



Efecto de VIP (60 µg/kg) sobre el flujo sanguíneo vaginal en presencia y ausencia de un inhibidor de NEP

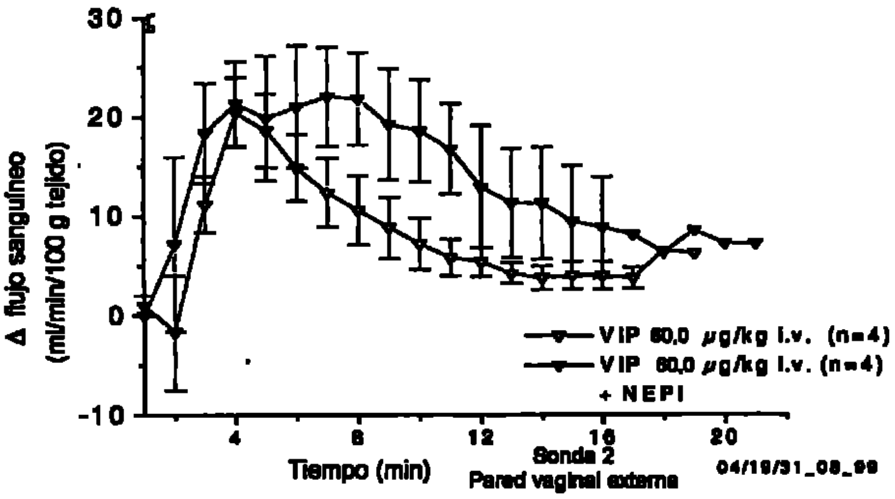
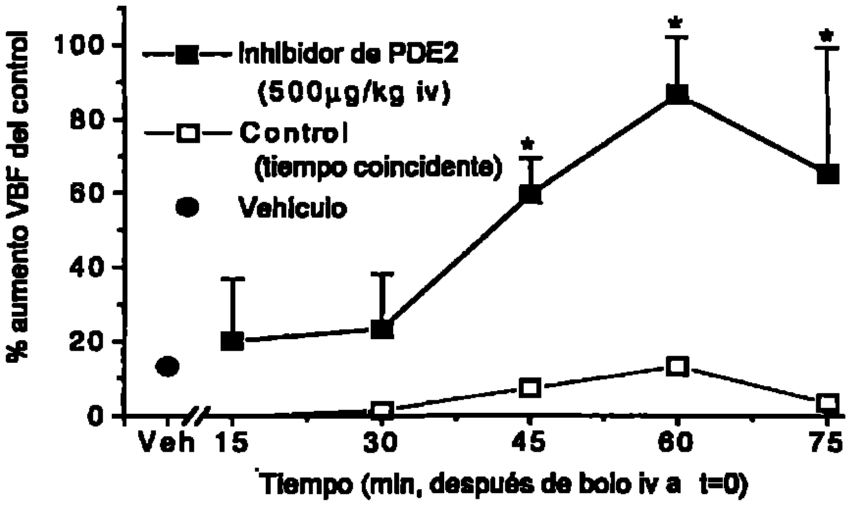


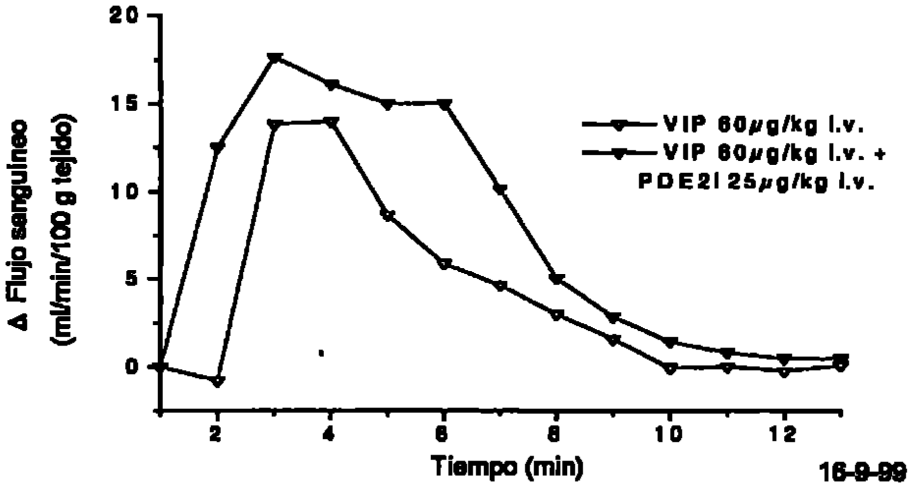
Figura 8

Efecto de un inhibidor de $PDE_{cAMP}$ de tipo 2 sobre los aumentos por estimulación del nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal



## Figura 9

### Efecto de un inhibidor de PDE$_{cAMP}$ de tipo 2 sobre los aumentos inducidos por VIP del flujo sanguíneo vaginal



## Figura 10

**Efecto del antagonista de NPY Y1 sobre los aumentos por estimulación del nervio pélvico del flujo sanguíneo vaginal**

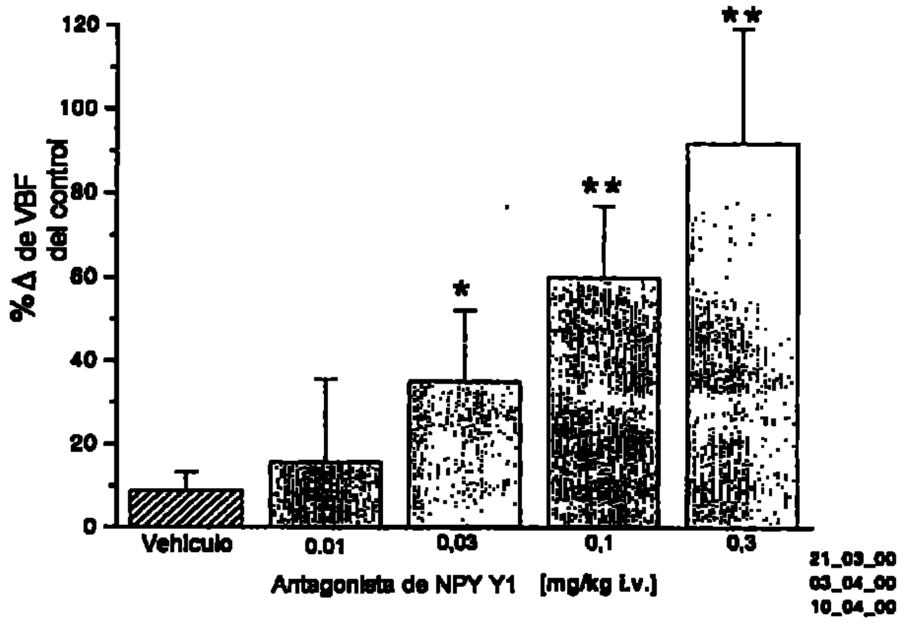
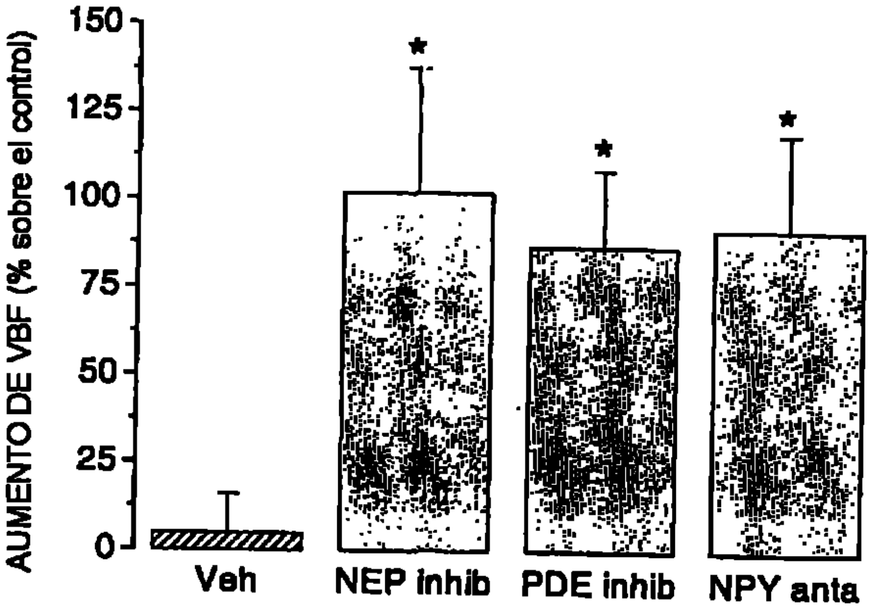


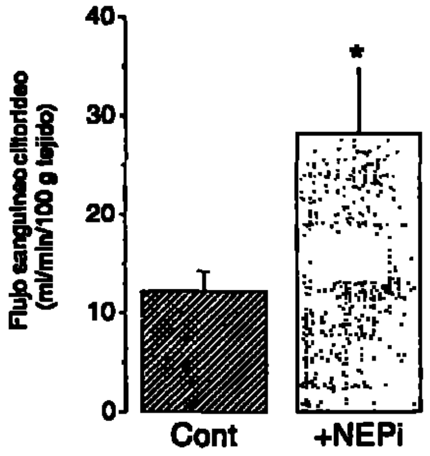
Figura 11

La estimulación de la señalización de cAMP potencia los aumentos mediados por el nervio del flujo sanguíneo vaginal (VBF) en conejo



## Figura 12

Efecto de un NEPi sobre los aumentos por estimulación del nervio pélvico del flujo sanguíneo clitorídeo



## LISTADO DE SECUENCIAS

### 1. NEP (EC 3.4.24.11)

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSMRNAEN 3181 pb mRNA PRI 12-sep-1993 |
| DEFINICION | mRNA humano para encefalinasa (EC 3.4.24.11) |
| ACCESO | X07166 |
| NID | g34757 |
| VERSION | X07166.1 GI: 34757 |
| PALABRAS CLAVE | encefalinasa, metaloproteína, endopeptidasa neutra |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 3181) |
| AUTORES | Malfroy, B., Kuang, W.J., Seeburg, P.H., Mason, A.J. y Schofield, P.R. |
| TITULO | Molecular cloning and amino acid sequence of human enkephalinase (neutral endopeptidase). |
| REVISTA | FEBS. Lett. 229 (1), 206-210 (1998) |
| MEDLINE | 88152222 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |

2496

2497

source 1...3181

/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/tissue_type="placenta"
/clone_lib="lambda gt10"
/clone="lambda H7"

CDS 18..2249

/note="enkephalinase (AA 1-743)"
/codon_start=1
/protein_id="CAA30157.1"
/db_xref="PID:g34758"
/db_xref="GI:34758"
/db_xref="SWISS-PROT:P08473"
/translation="MDITDINTPKPKKKQRWTPLEISLSVLVLLLTIIAVTMIALYAT
YDDGICKSSDCIKSAARLIQNMDATTEPCTDFFKYACGGWLKRNVIPETSSRYGNFDI
LRDELEVVLKDVLQEPKTEDIVAVQKAKALYRSCINESAIDSRGGEPLLKLLPDIYGW
PVATENWEQKYGASWTAEKAIAQLNSKYGKKVLINLFVGTDDKNSVNHVIHIDQPRLG
LPSRDYYECTGIYKEACTAYVDFMISVARLIRQEERLPIDENQLALEMNKVMELEKEI
ANATAKPEDRNDPMLLYNKMTLAQIQNNFSLEINGKPFSWLNFTNEIMSTVNISITNE
EDVVVYAPEYLTKLKPILTKYSARDLQNLMSWRFIMDLVSSLSRTYKESRNAFRKALY
GTTSETATWRRCANYVNGNMENAVGRLYVEAAFAGESKHVVEDLIAQIREVFIQTLDD
LTWMDAETKKRAEEKALAIKERIGYPDDIVSNDNKLNNEYLELNYKEDEYFENIIQNL
KFSQSKQLKKLREKVDKDEWISGAAVVNAFYSSGRNQIVFPAGILQPPFFSAQQSNSL
NYGGIGMVIGHEITHGFDDNGRNFNKDGDLVDWWTQQSASNFKEQSQCMVYQYGNFSW
DLAGGQHLNGINTLGENIADNGGLGQAYRAYQNYIKKNGEEKLLPGLDLNHKQLFFLN
FAQVWCGTYRPEYAVNSIKTDVHSPGNFRIIGTLQNSAEFSEAFHCRKNSYMNPEKKC
RVW"

misc_feature 3073..3078

/note="poly A signal"

5 RECUENTO DE BASES 1055 a, 582 c, 657 g, 887 t

ORIGEN

```
  1 gcaagtcaga aagtcagatg gatataactg atatcaacac tccaaagcca aagaagaaac
 61 agcgatggac tccactggag atcagcctct cggtccttgt cctgctcctc accatcatag
121 ctgtgacaat gatcgcactc tatgcaacct acgatgatgg tatttgcaag tcatcagact
181 gcataaaatc agctgctcga ctgatccaaa acatggatgc caccactgag ccttgtacag
```

```
 241 acttttcaa  atatgcttgc ggaggctggt tgaaacgtaa tgtcattccc gagaccagct
 301 cccgttacgg caactttgac attttaagag atgaactaga agtcgttttg aaagatgtcc
 361 ttcaagaacc caaaactgaa gatatagtag cagtgcagaa agcaaaagca ttgtacaggt
 421 cttgtataaa tgaatctgct attgatagca gaggtggaga acctctactc aaactgttac
 481 cagacatata tgggtggcca gtagcaacag aaaactggga gcaaaaatat ggtgcttctt
 541 ggacagctga aaaagctatt gcacaactga attctaaata tgggaaaaaa gtccttatta
 601 atttgtttgt tggcactgat gataagaatt ctgtgaatca tgtaattcat attgaccaac
 661 ctcgacttgg cctccccttct agagattact atgaatgcac tggaatctat aaagaggctt
 721 gtacagcata tgtggatttt atgatttctg tggccagatt gattcgtcag gaagaaagat
 781 tgcccatcga tgaaaaccag cttgctttgg aaatgaataa agttatggaa ttggaaaaag
 841 aaattgccaa tgctacggct aaacctgaag atcgaaatga tccaatgctt ctgtataaca
 901 agatgacatt ggcccagatc caaaataact tttcactaga gatcaatggg aagccattca
 961 gctggttgaa tttcacaaat gaaatcatgt caactgtgaa tattagtatt acaaatgagg
1021 aagatgtggt tgtttatgct ccagaatatt taaccaaact taagcccatt cttaccaaat
1081 attctgccag agatcttcaa aatttaatgt cctggagatt cataatggat cttgtaagca
1141 gcctcagccg aacctacaag gagtccagaa atgctttccg caaggccctt tatggtacaa
1201 cctcagaaac agcaacttgg agacgttgtg caaactatgt caatgggaat atggaaaatg
1261 ctgtggggag gctttatgtg gaagcagcat ttgctggaga gagtaaacat gtggtcgagg
1321 atttgattgc acagatccga gaagtttta ttcagacttt agatgacctc acttggatgg
1381 atgccgagac aaaaaagaga gctgaagaaa aggccttagc aattaaagaa aggatcggct
1441 atcctgatga cattgtttca aatgataaca aactgaataa tgagtacctc gagttgaact
1501 acaaagaaga tgaatacttc gagaacataa ttcaaaattt gaaattcagc caaagtaaac
1561 aactgaagaa gctccgagaa aaggtggaca aagatgagtg gataagtgga gcagctgtag
1621 tcaatgcatt ttactcttca ggaagaaatc agatagtctt cccagccggc attctgcagc
1681 ccccttctt tagtgcccag cagtccaact cattgaacta tgggggcatc ggcatggtca
1741 taggacacga aatcacccat ggcttcgatg acaatggcag aaactttaac aaagatggag
1801 acctcgttga ctggtggact caacagtctg caagtaactt taaggagcaa tcccagtgca
1861 tggtgtatca gtatggaaac ttttcctggg acctggcagg tggacagcac cttaatggaa
1921 ttaatacact gggagaaaac attgctgata atggaggtct tggtcaagca tacagagcct
1981 atcagaatta tattaaaaag aatggcgaag aaaaattact tcctggactt gacctaaatc
2041 acaaacaact atttttcttg aactttgcac aggtgtggtg tggaacctat aggccagagt
2101 atgcggttaa ctccattaaa acagatgtgc acagtccagg caatttcagg attattggga
2161 ctttgcagaa ctctgcagag ttttcagaag cctttcactg ccgcaagaat tcatacatga
2221 atccagaaaa gaagtgccgg gtttggtgat cttcaaaaga agcattgcag ccccttggcta
2281 gacttgccaa caccacagaa atggggaatt ctctaatcga aagaaaatgg gcccctagggg
2341 tcactgtact gacttgaggg tgattaacag agagggcacc atcacaatac agataacatt
2401 aggttgtcct agaaagggtg tggagggagg aagggggtct aaggtctatc aagtcaatca
2461 tttctcactg tgtacataat gcttaatttc taaagataat attactgttt atttctgttt
2521 ctcatatggt ctaccagttt gctgatgtcc ctagaaaaca atgcaaaacc tttgaggtag
2581 accaggattt ctaatcaaaa gggaaaagaa gatgttgaag aatacagtta ggcaccagaa
2641 gaacagtagg tgacactata gtttaaaaca cattgcctaa ctactagttt ttacttttat
2701 ttgcaacatt tacagtcctt caaaatcctt ccaaagaatt cttatacaca ttggggcctt
2761 ggagcttaca tagttttaaa ctcatttttg ccatacatca gttattcatt ctgtgatcat
2821 ttattttaag cactcttaaa gcaaaaaatg aatgtctaaa attgtttttt gttgtacctg
2881 ctttgactga tgctgagatt cttcaggctt cctgcaattt tctaagcaat ttcttgctct
2941 atctctcaaa acttggtatt tttcagagat ttatataaat gtaaaaataa taattttat
3001 atttaattat taactacatt tatgagtaac tattattata ggtaatcaat gaatattgaa
3061 gtttcagctt aaaataaaca gttgtgaacc aagatctata aagcgatata cagatgaaaa
3121 tttgagacta tttaaactta taaatcatat tgatgaaaag atttaagcac aaactttagg
3181 g
```

## 2. PDE de tipo 1

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSPDE1A3A 2008 pb mRNA PRI 12-abr-1996 |
| DEFINICION | mRNA de fosfodiesterasa de nucleótidos 3',5'-cíclicos humana (HSPDE1A3A), cd completo. |
| ACCESO | U40370 |
| NID | g1151108 |
| VERSION | U40370.1 GI: 1151108 |
| PALABRAS CLAVE | fosfodiesterasa estimulada por calmodulina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 2008) |
| AUTORES | Loughney, K., Martins., T.J., Harris, E.A., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., y Ferguson, K. |
| TITULO | Isolation and characterization of cDNAs corresponding to two human calcium, calmodulin-regulated, 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterases |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 271 (2), 796-806 (1996) |
| MEDLINE | 96132810 |

2499
2500

REFERENCIA 2 (bases 1 a 2008)

AUTORES Loughney, K., Martins., T.J., Harris, E.A.S., Sadhu, K., Hicks, J.B., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., y Ferguson, K.

TITULO Envío directo

REVISTA Enviado el 7 de noviembre de 1995. Kate Loughney, ICOS, 22021 20th Ave. S.E., Bothell, WA 98021, EE.UU.

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

source 1...2008

/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
gene 85..1692
/gene="PDE1A"
CDS 85..1692
/gene="PDE1A"
/note="PDE1A3; type I phosphodiesterase"
/codon_start=1
/product="3',5' cyclic nucleotide phosphodiesterase"
/protein_id="AAC50436.1"
/db_xref="PID:g1151109"
/db_xref="GI:1151109"
/translation="MGSSATEIEELENTTFKYLTGEQTEKMWQRLKGILRCLVKQLER
GDVNVVDLKKNIEYAASVLEAVYIDETRRLLDTEDELSDIQTDSVPSEVRDWLASTFT
RKMGMTKKKPEEKPKFRSIVHAVQAGIFVERMYRKTYHMVGLAYPAAVIVTLKDVDKW
SFDVFALNEASGEHSLKFMIYELFTRYDLINRFKIPVSCLITFAEALEVGYSKYKNPY
HNLIHAADVTQTVHYIMLHTGIMHWLTELEILAMVFAAAIHDYEHTGTTNNFHIQTRS
DVAILYNDRSVLENHHVSAAYRLMQEEEMNILINLSKDDWRDLRNLVIEMVLSTDMSG
HFQQIKNIRNSLQQPEGIDRAKTMSLILHAADISHPAKSWKLHYRWTMALMEEFFLQG
DKEAELGLPFSPLCDRKSTMVAQSQIGFIDFIVEPTFSLLTDSTEKIVIPLIEEASKA
ETSSYVASSSTTIVGLHIADALRRSNTKGSMSDGSYSPDYSLAAVDLKSFKNNLVDII
QQNKERWKELAAQEARTSSQKCEFIHQ"

RECUENTO DE BASES 627 a, 400 c, 437 g, 544 t

2500
2501

ORIGEN

```
   1 gaattctgat gtgcttcagt gcacagaaca gtaacagatg agctgctttt ggggagagct
  61 tgagtactca gtcggagcat catcatgggg tctagtgcca cagagattga agaattggaa
 121 aacaccactt ttaagtatct tacaggagaa cagactgaaa aaatgtggca gcgcctgaaa
 181 ggaatactaa gatgcttggt gaagcagctg gaaagaggtg atgttaacgt cgtcgactta
 241 aagaagaata ttgaatatgc ggcatctgtg ctggaagcag tttatatcga tgaaacaaga
 301 agacttctgg atactgaaga tgagctcagt gacattcaga ctgactcagt cccatctgaa
 361 gtccgggact ggttggcttc tacctttaca cggaaaatgg ggatgacaaa aaagaaacct
 421 gaggaaaaac caaaatttcg gagcattgtg catgctgttc aagctggaat ttttgtggaa
 481 agaatgtacc gaaaaacata tcatatggtt ggtttggcat atccagcagc tgtcatcgta
 541 acattaaagg atgttgataa atggtctttc gatgtatttg ccctaaatga agcaagtgga
 601 gagcatagtc tgaagtttat gatttatgaa ctgtttacca gatatgatct tatcaaccgt

 661 ttcaagattc ctgtttcttg cctaatcacc tttgcagaag ctttagaagt tggttacagc
 721 aagtacaaaa atccatatca caatttgatt catgcagctg atgtcactca aactgtgcat
 781 tacataatgc ttcatacagg tatcatgcac tggctcactg aactggaaat tttagcaatg
 841 gtctttgctg ctgccattca tgattatgag catacaggga caacaaacaa ctttcacatt
 901 cagacaaggt cagatgttgc cattttgtat aatgatcgct ctgtccttga gaatcaccac
 961 gtgagtgcag cttatcgact tatgcaagaa gaagaaatga atatcttgat aaatttatcc
1021 aaagatgact ggagggatct tcggaaccta gtgattgaaa tggttttatc tacagacatg
1081 tcaggtcact tccagcaaat taaaaatata agaaacagtt tgcagcagcc tgaagggatt
1141 gacagagcca aaaccatgtc cctgattctc cacgcagcag acatcagcca cccagccaaa
1201 tcctggaagc tgcattatcg gtggaccatg gccctaatgg aggagttttt cctgcaggga
1261 gataaagaag ctgaattagg gcttccattt tccccacttt gtgatcggaa gtcaaccatg
1321 gtggcccagt cacaaatagg tttcatcgat ttcatagtag agccaacatt ttctcttctg
1381 acagactcaa cagagaaaat tgttattcct cttatagagg aagcctcaaa agccgaaact
1441 tcttcctatg tggcaagcag ctcaaccacc attgtggggt tacacattgc tgatgcacta
1501 agacgatcaa atacaaaagg ctccatgagt gatgggtcct attccccaga ctactccctt
1561 gcagcagtgg acctgaagag tttcaagaac aacctggtgg acatcattca gcagaacaaa
1621 gagaggtgga aagagttagc tgcacaagaa gcaagaacca gttcacagaa gtgtgagttt
1681 attcatcagt aaacaccttt aagtaaaacc tcgtgcatgg tggcagctct aatttgacca
1741 aaagacttgg agattttgat tatgcttgct ggaaatctac cctgtcctgt gtgagacagg
1801 aaatctattt ttgcagattg ctcaataagc atcatgagcc acataaataa cagctgtaaa
1861 ctccttaatt caccgggctc aactgctacc gaacagattc atctagtggc tacatcagca
1921 ccttgtgctt tcagatatct gtttcaatgg cattttgtgg catttgtctt taccgagtgc
1981 caataaattc tctttgagca aaaaaaaa
```

## 2. PDE de tipo 2

LOCUS HSU67733 4240 pb mRNA PRI 21-may-1997

DEFINICION mRNA de fosfodiesterasa de nucleótidos

| | |
|---|---|
| | 3',5'-cíclicos humana estimulada por cGMP PDE2A3 (PDE2A), cd completo. |
| ACCESO | U67733 |
| NID | g2108051 |
| VERSION | U67733.1 GI: 2108051 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens . |
| | Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 4240) |
| AUTORES | Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K. and Loughley, K. |
| TITULO | Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotides phosphodiesterase |
| REVISTA | Gene 191 (1), 89-95 (1997) |
| MEDLINE | 97354299 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 4240) |
| AUTORES | Rosman, G.J., Martins, T.J., Sonnenburg, W.K., Beavo, J.A., Ferguson, K. and Loughley, K. |
| TITULO | Envío directo |

REVISTA Enviado el 21 de agosto de 1996. ICOS Corporation, 22021 20th Ave. S.E., Bothell, WA 98021, EE.UU.

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

source 1...4240

/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"

gene 162..2987

/gene="PDE2A"

CDS 162..2987
/gene="PDE2A"
/function="cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase"
/note="PDE2 family; splice variant 3"
/codon_start=1
/product="PDE2A3"
/protein_id="AAC51320.1"
/db_xref="PID:g2108052"
/db_xref="GI:2108052"
/translation="MGQACGHSILCRSQQYPAARPAEPRGQQVFLKPDEPPPPPQPCA
DSLQDALLSLGSVIDISGLQRAVKEALSAVLPRVETVYTYLLDGESQLVCEDPPHELP
QEGKVREAIISQKRLGCNGLGFSDLPGKPLARLVAPLAPDTQVLVMPLADKEAGAVAA
VILVHCGQLSDNEEWSLQAVEKHTLVALRRVQVLQQRGPREAPRAVQNPPEGTAEDQK
GGAAYTDRDRKILQLCGELYDLDASSLQLKVLQYLQQETRASRCCLLLVSEDNLQLSC
KVIGDKVLGEEVSFPLTGCLGQVVEDKKSIQLKDLTSEDVQQLQSMLGCELQAMLCVP
VISRATDQVVALACAFNKLEGDLFTDEDEHVIQHCFHYTSTVLTSTLAFQKEQKLKCE
CQALLQVAKNLFTHLDDVSVLLQEIITEARNLSNAEICSVFLLDQNELVAKVFDGGVV
DDESYEIRIPADQGIAGHVATTGQILNIPDAYAHPLFYRGVDDSTGFRTRNILCFPIK
NENQEVIGVAELVNKINGPWFSKFDEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHL
ANEMMMYHMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQ
DMNFINNYKIDCPTLARFCLMVKKGYRDPPYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLE
DIEIFALFISCMCHDLDHRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSVMERHHFAQAIAILNT
HGCNIFDHFSRKDYQRMLDLMRDIILATDLAHHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHHRL
LLCLLMTSCDLSDQTKGWKTTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIP
ELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNREHWTKVSHKFTIRGLPSNNSLD
FLDEEYEVPDLDGTRAPINGCCSLDAE"

RECUENTO DE BASES 902 a, 1260 c, 1202 g, 876 t

ORIGEN

```
   1 cagcagagct ggattggggt gttgagtcca ggctgagtag ggggcagccc actgctcttg
  61 gtccctgtgc ctgctggggg tgccctgccc tgaactccag gcagcgggga cagggcgagg
 121 tgccacctta gtctggctgg ggaggcggac gatgaggagt gatggggcag gcatgcggcc
 181 actccatcct ctgcaggagc cagcagtacc cggcagcgcg accggctgag ccgcggggcc
 241 agcaggtctt cctcaagccg gacgagccgc cgccgccgcc gcagccatgc gccgacagcc
 301 tgcaggacgc cttgctgagt ctgggctctg tcatcgacat ttcaggcctg caacgtgctg
 361 tcaaggaggc cctgtcagct gtgctccccc gagtggaaac tgtctacacc tacctactgg
 421 atggtgagtc ccagctggtg tgtgaggacc ccccacatga gctgccccag gaggggaaag
 481 tccgggaggc tatcatctcc cagaagcggc tgggctgcaa tgggctgggc ttctcagacc
 541 tgccagggaa gcccttggcc aggctggtgg ctccactggc tcctgatacc caagtgctgg
 601 tcatgccgct agcggacaag gaggctgggg ccgtggcagc tgtcatcttg gtgcactgtg
 661 gccagctgag tgataatgag gaatggagcc tgcaggcggt ggagaagcat accctggtcg
 721 ccctgcggag ggtgcaggtc ctgcagcagc gcgggcccag ggaggctccc cgagccgtcc
 781 agaacccccc ggaggggacg gcggaagacc agaagggcgg ggcggcgtac accgaccgcg
 841 accgcaagat cctccaactg tgcggggaac tctacgacct ggatgcctct tccctgcagc
 901 tcaaagtgct ccaatacctg cagcaggaga cccgggcatc ccgctgctgc ctcctgctgg
 961 tgtcggagga caatctccag ctttcttgca aggtcatcgg agacaaagtg ctcggggaag
1021 aggtcagctt tcccttgaca ggatgcctgg gccaggtggt ggaagacaag aagtccatcc
1081 agctgaagga cctcacctcc gaggatgtac aacagctgca gagcatgttg ggctgtgagc
1141 tgcaggccat gctctgtgtc cctgtcatca gccgggccac tgaccaggtg gtggccttgg
1201 cctgcgcctt caacaagcta gaaggagact tgttcaccga cgaggacgag catgtgatcc
1261 agcactgctt ccactacacc agcaccgtgc tcaccagcac cctggccttc cagaaggaac
1321 agaaactcaa gtgtgagtgc caggctcttc tccaagtggc aaagaacctc ttcacccacc
1381 tggatgacgt ctctgtcctg ctccaggaga tcatcacgga ggccagaaac ctcagcaacg
1441 cagagatctg ctctgtgttc ctgctggatc agaatgagct ggtggccaag gtgttcgacg
1501 ggggcgtggt ggatgatgag agctatgaga tccgcatccc ggccgatcag ggcatcgcgg
1561 gacacgtggc gaccacgggc cagatcctga acatccctga cgcatatgcc catccgcttt
1621 tctaccgcgg cgtggacgac agcaccggct tccgcacgcg caacatcctc tgcttcccca
```

250.4

~~250~~

```
1681 tcaagaacga gaaccaggag gtcatcggtg tggccgagct ggtgaacaag atcaatgggc
1741 catggttcag caagttcgac gaggacctgg cgacggcctt ctccatctac tgcggcatca
1801 gcatcgccca ttctctccta tacaaaaaag tgaatgaggc tcagtatcgc agccacctgg
1861 ccaatgagat gatgatgtac cacatgaagg tctccgacga tgagtatacc aaacttctcc
1921 atgatgggat ccagcctgtg gctgccattg actccaattt tgcaagtttc acctataccc
1981 ctcgttccct gcccgaggat gacacgtcca tggccatcct gagcatgctg caggacatga
2041 atttcatcaa caactacaaa attgactgcc cgaccctggc ccggttctgt ttgatggtga
2101 agaagggcta ccgggatccc ccctaccaca actggatgca cgccttttct gtctccccact
2161 tctgctacct gctctacaag aacctggagc tcaccaacta cctcgaggac atcgagatct
2221 ttgccttgtt tatttcctgc atgtgtcatg acctggacca cagaggcaca aacaactctt
2281 tccaggtggc ctcgaaatct gtgctggctg cgctctacag ctctgagggc tccgtcatgg
2341 agaggcacca ctttgctcag gccatcgcca tcctcaacac ccacggctgc aacatctttg
2401 atcatttctc ccggaaggac tatcagcgca tgctggatct gatgcgggac atcatcttgg
2461 ccacagacct ggcccaccat ctccgcatct tcaaggacct ccagaagatg gctgaggtgg
2521 gctacgaccg aaacaacaag cagcaccaca gacttctcct ctgcctcctc atgacctcct
2581 gtgacctctc tgaccagacc aagggctgga agactacgag aaagatcgcg gagctgatct
2641 acaaagaatt cttctcccag ggagacctgg agaaggccat gggcaacagg ccgatggaga
2701 tgatggaccg ggagaaggcc tatatccctg agctgcaaat cagcttcatg gagcacattg
2761 caatgcccat ctacaagctg ttgcaggacc tgttccccaa agcggcagag ctgtacgagc
2821 gcgtggcctc caaccgtgag cactggacca aggtgtccca caagttcacc atccgcggcc
2881 tcccaagtaa caactcgctg gacttcctgg atgaggagta cgaggtgcct gatctggatg
2941 gcactagggc cccccatcaat ggctgctgca gccttgatgc tgagtgatcc cctccaggac
3001 acttccctgc ccaggccacc tcccacagcc ctccactggt ctggccagat gcactgggaa
3061 cagagccacg ggtcctgggt cctagaccag gacttcctgt gtgaccctgg acaagtacta
3121 ccttcctggg cctcagcttt ctcgtctgta taatggaagc aagacttcca acctcacgga
3181 gactttgtaa tttgcttctc tgagagcaca ggggtgacca atgagcagtg ggccctactc
3241 tgcacctctg accacacctt ggcaagtctt tcccaagcca ttctttgtct gagcagcttg
3301 atggtttctc cttgccccat ttctgcccca ccagatcttt gctcctttcc ctttgaggac
3361 tccccacccctt tgggtctcca ggatcctcat ggaaggggaa ggtgagacat ctgagtgagc
3421 agagtgtggc atcttggaaa cagtccttag ttctgtggga ggactagaaa cagccgcggc
3481 gaaggccccc tgaggaccac tactatactg atggtgggat tgggacctgg gggatacagg
3541 ggccccagga agaagctggc cagaggggca gctcagtgct ctgcagagag ggccctggg
3601 gagaagcagg atgggattga tgggcaggag ggatccccgc actgggagac aggcccaggt
3661 atgaatgagc cagccatgct tcctcctgcc tgtgtgacgc tgggcgagtc tcttcccctg
3721 tctgggccaa acagggagcg ggtaagacaa tccatgctct aagatccatt ttagatcaat
3781 gtctaaaata gctctatggc tctgcggagt cccagcagag gctatggaat gtttctgcaa
3841 ccctaaggca cagagagcca accctgagtg tctcagaggc cccctgagtg ttccccttgg
3901 cctgagcccc ttacccattc ctgcagccag tgagagacct ggcctcagcc tggcagcgct
3961 ctcttcaagg ccatatccac ctgtgccctg ggcttggga gaccccatag gccgggactc
4021 ttgggtcagc ccgccactgg cttctctctt tttctccgtt tcattctgtg tgcgttgtgg
4081 ggtgggggag ggggtccacc tgccttacct ttctgagttg cctttagaga gatgcgtttt
4141 tctaggactc tgtgcaactg tcgtatatgg tcccgtgggc tgaccgcttt gtacatgaga
4201 ataaatctat ttctttctac caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

**4. NPY**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HUMNPY 551 pb mRNA PRI 7-ene-1995 |
| DEFINICION | mRNA de neuropéptido Y humano (NPY), cd completo. |
| ACCESO | K01911 |
| NID | g189273 |
| VERSION | K01911.1 GI:189273 |
| PALABRAS CLAVE | neuropéptido Y |
| FUENTE | feocromocitoma humano, cDNA a mRNA, clon pNPY3-75 |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 551) |
| AUTORES | Minth, C.D., Bloom, S.R., Polak, J.M. y Dixon, J.E. |
| TITULO | Cloning, characterization and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine |
| REVISTA | Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 (14), 4577-4581 (1984) |
| MEDLINE | 84272678 |
| COMENTARIO | El neuropéptido Y (NPY) es uno de los péptidos más abundantes en el sistema |

nervioso mamífero, y su extensa distribución sugiere un papel neurotransmisor o modulador. También se encuentra en algunas células de cromafina de la médula suprarrenal.

```
CARACTERISTICAS          Localización/Cualificadores

source              1...551

                    /organism="Homo sapiens"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /tissue_type="pheochromocytoma"
                    /map="7pter-q22"
   mRNA             <1..551
                    /gene="NPY"
                    /note="G00-119-456"
   gene             1..551
                    /gene="NPY"
   sig_peptide      87..170
                    /gene="NPY"
                    /note="G00-119-456"
   CDS              87..380
                    /gene="NPY"
                    /codon_start=1
                    /db_xref="GDB:G00-119-456"
                    /product="neuropeptide Y"
                    /protein_id="AAA59944.1"
                    /db_xref="PID:g189274"
                    /db_xref="GI:189274"
                    /translation="MLGNKRLGLSGLTLALSLLVCLGALAEAYPSKPDNPGEDAPAED
                    MARYYSALRHYINLITRQRYGKRSSPETLISDLLMRESTENVPRTRLEDPAMW"
   mat_peptide      171..278
                    /gene="NPY"
                    /note="G00-119-456"
                    /product="neuropeptide Y"
```

RECUENTO DE BASES 131 a, 171 c, 129 g, 120 t

ORIGEN 51 pb cadena arriba de un sitio RsaI

```
  1 accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc
 61 ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgactgggg ctgtccggac
121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgaggcg taccccctcca
181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
301 cactgatttc agacctcttg atgagagaaa gcacagaaaa tgttcccaga actcggcttg
361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
421 gcccatattt catcgtgtaa aacgagaatc cacccatcct accaatgcat gcagccactg
481 tgctgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
541 atcatgcatt c
```

## 5. Receptor de NPY Y1

LOCUS A26481 2624 pb mRNA PAT 17-oct-1995

DEFINICION cDNA del gen del receptor Y1 de NPY humano.

ACCESO A26481

NID g1247452

VERSION A26481.1 GI:1247452

PALABRAS CLAVE -

FUENTE humana

ORGANISMO Homo sapiens

Eukaryota, Metazoa, Chordata, Vertebrata,
Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini,
Hominidae, Homo.

REFERENCIA 1 (bases 1 a 2624)

AUTORES -

TITULO HUMAN NEUROPEPTIDE Y-Y1 RECEPTOR

REVISTA Patente: WO 9309227-A 3 13 de mayo de 1993)

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

```
source          1..2624
               /organism="Homo sapiens"
               /db_xref="taxon:9606"
  CDS          152..1306
               /codon_start=1
               /product="neuropeptide Y Y1 receptor"
               /protein_id="CAA01819.1"
               /db_xref="PID:e205126"
               /db_xref="PID:g1247453"
               /db_xref="GI:1247453"
               /db_xref="SWISS-PROT:P25929"
               /translation="MNSTLFSQVENHSVHSNFSEKNAQLLAFENDDCHLPLAMIFTLA
               LAYGAVIILGVSGNLALIIIILKQKEMRNVTNILIVNLSFSDLLVAIMCLPFTFVYTL
               MDHWVFGEAMCKLNPFVQCVSITVSIFSLVLIAVERHQLIINPRGWRPNNRHAYVGIA
               VIWVLAVASSLPFLIYQVMTDEPFQNVTLDAYKDKYVCFDQFPSDSHRLSYTTLLLVL
               QYFGPLCFIFICYFKIYIRLKRRNNMMDKMRDNKYRSSETKRINIMLLSIVVAFAVCW
               LPLTIFNTVFDWNHQIIATCNHNLLFLLCHLTAMISTCVNPIFYGFLNKNFQRDLQFF
               FNFCDFRSRDDDYETIAMSTMHTDVSKTSLKQASPVAFKKINNNDDNEKI"
```

RECUENTO DE BASES 791 a, 479 c, 473 g, 878 t, 3 otras

ORIGEN

250.9

1 attgttcagt tcaagggaat gaagaattca gaataatttt ggtaaatgga ttccaatatc
61 gggaataaga ataagctgaa cagttgacct gctttgaaga aacatactgt ccatttgtct
121 aaaataatct ataacaacca aaccaatcaa aatgaattca acattatttt cccaggttga
181 aaatcattca gtccactcta atttctcaga gaagaatgcc cagcttctgg cttttgaaaa
241 tgatgattgt catctgccct tggccatgat atttacctta gctcttgctt atggagctgt
301 gatcattctt ggtgtctctg gaaacctggc cttgatcata atcatcttga aacaaaagga
361 gatgagaaat gttaccaaca tcctgattgt gaacctttcc ttctcagact tgcttgttgc
421 catcatgtgt ctcccccttta catttgtcta cacattaatg gaccactggg tctttggtga
481 ggcgatgtgt aagttgaatc cttttgtgca atgtgtttca atcactgtgt ccatttctc
541 tctggttctc attgctgtgg aacgacatca gctgataatc aaccctcgag ggtggagacc
601 aaataataga catgcttatg taggtattgc tgtgatttgg gtccttgctg tggcttcttc
661 tttgcctttc ctgatctacc aagtaatgac tgatgagccg ttccaaaatg taacacttga
721 tgcgtacaaa gacaaatacg tgtgctttga tcaatttcca tcggactctc ataggttgtc
781 ttataccact ctcctcttgg tgctgcagta ttttggtcca ctttgtttta tatttatttg
841 ctacttcaag atatatatac gcctaaaaag gagaaacaac atgatggaca agatgagaga
901 caataagtac aggtccagtg aaaccaaaag aatcaatatc atgctgctct ccattgtggt
961 agcatttgca gtctgctggc tccctcttac catctttaac actgtgtttg attggaatca
1021 tcagatcatt gctacctgca accacaatct gttattcctg ctctgccacc tcacagcaat
1081 gatatccact tgtgtcaacc ccatatttta tgggttcctg aacaaaaact tccagagaga
1141 cttgcagttc ttcctcaact tttgtgattt ccggtctcgg gatgatgatt atgaaacaat
1201 agccatgtcc acgatgcaca cagatgtttc caaaacttct ttgaagcaag caagcccagt
1261 cgcatttaaa aaaatcaaca acaatgatga taatgaaaaa atctgaaact acttatagcc
1321 tatggtcccg gatgacatct gtttaaaaac aagcacaacc tgcaacatac tttgattacc
1381 tgttctccca aggaatgggg ttgaaatcat ttgaaaatga ctaagatttt cttgtcttgc

1441 ttttttactg cttttgttgt agtgtcataa ttacatttgg aacaaaaggt gtgggctttg
1501 gggtcttctg gaaatagttt tgaccagaca tctttgaagt gctttttgtg aatttatgca
1561 tataatataa agacttttat actgtactta ttggaatgaa atttctttaa agtattacga
1621 tnnnctgact tcagaagtac ctgccatcca atacggtcat tagattgggt catcttgatt
1681 agattagatt agattagatt gtcaacagat tgggccatcc ttactttatg ataggcatca
1741 ttttagtgtg ttacaatagt aacagtatgc aaaagcagca ttcaggagcc gaaagatagt
1801 cttgaagtca ttcagaagtg gtttgaggtt tctgtttttt ggtggttttt gtttgttttt
1861 tttttttttc accttaaggg aggctttcat ttcctcccga ctgattgtca cttaaatcaa
1921 aatttaaaaa tgaataaaaa gacatacttc tcagctgcaa atattatgga gaattgggca
1981 cccacaggaa tgaagagaga aagcagctcc ccaacttcaa aaccattttg gtacctgaca
2041 acaagagcat tttagagtaa ttaatttaat aaagtaaatt agtattgctg caaatagcta
2101 aattatattt atttgaattg atggtcaaga gattttccat tttttttaca gactgttcag
2161 tgtttgtcaa gcttctggtc taatatgtac tcgaaagact ttccgcttac aatttgtaga
2221 aacacaaata tcgttttcca tacagcagtg cctatatagt gactgatttt aactttcaat
2281 gtccatcttt caaaggaagt aacaccaagg tacaatgtta aaggaatatt cactttacct
2341 agcagggaaa aatacacaaa aactgcagat acttcatata gcccatttta acttgtataa
2401 actgtgtgac ttgtggcgtc ttataaataa tgcactgtaa agattactga atagttgtgt
2461 catgttaatg tgcctaattt catgtatctt gtaatcatga ttgagcctca gaatcatttg
2521 gagaaactat atttaaaaga acaagacata cttcaatgta ttatacagat aaagtattac
2581 atgtgtttga ttttaaaagg gcggacattt tattaaaatc aagg

**6. Receptor de NPY Y2**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSU36269 1200 pb mRNA PRI 14-nov-1995 |
| DEFINICION | mRNA del receptor Y2 de neuropéptido Y/péptido YY humano, cd completo. |
| ACCESO | U36269 |
| NID | g1063633 |
| VERSION | U36269.1 GI:1063633 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1200) |
| AUTORES | Gerald, C., Walker, M.W., Vayssem P.J., He, C., Brancheck, T.A. y Weinshank, R.L. |
| TITULO | Expression cloning and pharmacological characterization of a human hippocampal neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor subtype |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 270 (45), 26758-26761 (1995) |
| MEDLINE | 96070760 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 1200) |
| AUTORES | Gerald, C.A. |

25111

TITULO Envío directo

REVISTA Enviada el 13 de septiembre de 1995. Christophe A. Gerald, Synaptic Pharmaceutical Corporation, Molecular Biology, 215 College Road, Paramus, NJ 07652, EE.UU.

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

source 1..1200

/organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"
/clone="hhY2"
/sex="male"
/tissue_type="brain hippocampus"
/dev_stage="adult"

5'UTR 1..20

```
CDS             21..1166
                /note="NPY/PYY Y2 receptor"
                /codon_start=1
                /product="neuropeptide Y/peptide YY Y2 receptor"
                /protein_id="AAC50281.1"
                /db_xref="PID:g1063634"
                /db_xref="GI:1063634"
                /translation="MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGPQTTPRGELVPDPEPELIDST
                KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTL
                CLPFTLTYTLMGEWKMGPVLCHLVPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKI
                SKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEKSIYGTV
                YSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAANDHYHQRRQKTTKMLVCVVVV
                FAVSWLPLHAFQLAVDIDSQVLDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRK
                AFLSAFRCEQRLDAIHSEVSVTFKAKKNLEVRKNSGPNDSFTEATNV"
3'UTR           1164..1200
```

RECUENTO DE BASES 292 a, 295 c, 299 g, 314 t

ORIGEN

```
   1 caagtggacc tgtactgaaa atgggtccaa taggtgcaga ggctgatgag aaccagacag
  61 tggaagaaat gaaggtggaa caatacgggc cacaaacaac tcctagaggt gaactggtcc
 121 ctgaccctga gccagagctt atagatagta ccaagctgat tgaggtacaa gttgttctca
 181 tattggccta ctgctccatc atcttgcttg gggtaattgg caactccttg gtgatccatg
 241 tggtgatcaa attcaagagc atgcgcacag taaccaactt tttcattgcc aatctggctg
 301 tggcagatct tttggtgaac actctgtgtc taccgttcac tcttacctat accttaatgg
 361 gggagtggaa aatgggtcct gtcctgtgcc acctggtgcc ctatgcccag ggcctggcag
 421 tacaagtatc cacaatcacc ttgacagtaa ttgccctgga ccggcacagg tgcatcgtct
 481 accacctaga gagcaagatc tccaagcgaa tcagcttcct gattattggc ttggcctggg
 541 gcatcagtgc cctgctggca agtcccctgg ccatcttccg ggagtattcg ctgattgaga
 601 tcatcccgga ctttgagatt gtggcctgta ctgaaaagtg gcctggcgag gagaagagca
 661 tctatggcac tgtctatagt ctttcttcct tgttgatctt gtatgttttg cctctgggca
 721 ttatatcatt ttcctacact cgcatttgga gtaaattgaa gaaccatgtc agtcctggag
 781 ctgcaaatga ccactaccat cagcgaaggc aaaaaaccac caaaatgctg gtgtgtgtgg
 841 tggtggtgtt tgcggtcagc tggctgcctc tccatgcctt ccagcttgcc gttgacattg
 901 acagccaggt cctggacctg aaggagtaca aactcatctt cacagtgttc cacatcatcg
 961 ccatgtgctc cacttttgcc aatcccctte tctatggctg gatgaacagc aactacagaa
1021 aggctttcct ctcggccttc cgctgtgagc agcggttgga tgccattcac tctgaggtgt
1081 ccgtgacatt caaggctaaa aagaacctgg aggtcagaaa gaacagtggc cccaatgact
1141 ctttcacaga ggctaccaat gtctaaggaa gctgtggtgt gaaaatgtat ggatgaattc
```

7. **Receptor de NPY Y5**

| | |
|---|---|
| LOCUS | HSU66275 1370 pb mRNA PRI 18-oct-1996 |
| DEFINICION | mRNA del receptor Y5 de neuropéptido humano (NPYR5), cd completo. |
| ACCESO | U66275 |
| NID | g1620655 |
| VERSION | U66275.1 GI:1620655 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1370) |
| AUTORES | Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., DeCarr, L.B:, Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang., P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velázquez, N. y McCaleb, M.L. |
| TITULO | Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behaviour |
| REVISTA | J. Biol. Chem. 271 (42), 26315-26319 (1996) |
| MEDLINE | 96421636 |
| REFERENCIA | 2 (bases 1 a 1370) |
| AUTORES | Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., |

2514

DeCarr, L.B:, Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang., P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., Velázquez, N. y McCaleb, M.L.

TITULO Envío directo

REVISTA Enviada el 6 de agosto de 1996. Metabolic Disorders. Bayer Corporation, 400 Morgan Lane, West Haven, CT 06516, EE.UU.

CARACTERISTICAS Localización/Cualificadores

```
source          1..1370
                /organism="Homo sapiens"
                /db_xref="taxon:9606"
   gene         18..1355
                /gene="NPYR5"
   CDS          18..1355
                /gene="NPYR5"
                /function="G protein-coupled receptor"
                /codon_start=1
                /product="neuropeptide Y5 receptor"
                /protein_id="AAC50741.1"
                /db_xref="PID:g1620656"
                /db_xref="GI:1620656"
                /translation="MDLELDEYYNKTLATENNTAATRNSDFPVWDDYKSSVDDLQYFL
                IGLYTFVSLLGFMGNLLILMALMKKRNQKTTVNFLIGNLAFSDILVVLFCSPFTLTSV
                LLDQWMFGKVMCHIMPFLQCVSVLVSTLILISIAIVRYHMIKHPISNNLTANHGYFLI
                ATVWTLGFAICSPLPVFHSLVELQETFGSALLSSRYLCVESWPSDSYRIAFTISLLLV
                QYILPLVCLTVSHTSVCRSISCGLSNKENRLEENEMINLTLHPSKKSGPQVKLSGSHK
                WSYSFIKKHRRRYSKKTACVLPAPERPSQENHSRILPENFGSVRSQLSSSSKFIPGVP
                TCFEIKPEENSDVHELRVKRSVTRIKKRSRSVFYRLTILILVFAVSWMPLHLFHVVTD
                FNDNLISNRHFKLVYCICHLLGMMSCCLNPILYGFLNNGIKADLVSLIHCLHM"
```

RECUENTO DE BASES 392 a, 263 c, 257 g, 458 t

ORIGEN

```
   1 ccaagcagga ctataatatg gatttagagc tcgacgagta ttataacaag acacttgcca
  61 cagagaataa tactgctgcc actcggaatt ctgatttccc agtctgggat gactataaaa
 121 gcagtgtaga tgacttacag tattttctga ttgggctcta tacatttgta agtcttcttg
 181 gctttatggg gaatctactt attttaatgg ctctcatgaa aaagcgtaat cagaagacta

 241 cggtaaactt cctcataggc aatctggcct tttctgatat cttggttgtg ctgttttgct
 301 cacctttcac actgacgtct gtcttgctgg atcagtggat gtttggcaaa gtcatgtgcc
 361 atattatgcc ttttcttcaa tgtgtgtcag ttttggtttc aactttaatt ttaatatcaa
 421 ttgccattgt caggtatcat atgataaaac atcccatatc taataattta acagcaaacc
 481 atggctactt tctgatagct actgtctgga cactaggttt tgccatctgt tctcccctta
 541 cagtgtttca cagtcttgtg gaacttcaag aaacatttgg ttcagcattg ctgagcagca
 601 ggtatttatg tgttgagtca tggccatctg attcatacag aattgccttt actatctctt
 661 tattgctagt tcagtatatt ctgcccttag tttgtcttac tgtaagtcat acaagtgtct
 721 gcagaagtat aagctgtgga ttgtccaaca aagaaaacag acttgaagaa aatgagatga
 781 tcaacttaac tcttcatcca tccaaaaaga gtgggcctca ggtgaaactc tctggcagcc
 841 ataaatggag ttattcattc atcaaaaaac acagaagaag atatagcaag aagacagcat
 901 gtgtgttacc tgctccagaa agaccttctc aagagaacca ctccagaata cctccagaaa
 961 actttggctc tgtaagaagt cagctctctt catccagtaa gttcatacca ggggtcccca
1021 cttgctttga gataaaacct gaagaaaatt cagatgttca tgaattgaga gtaaaacgtt
1081 ctgttacaag aataaaaaag agatctcgaa gtgttttcta cagactgacc atactgatat
1141 tagtatttgc tgttagttgg atgccactac acctttttca tgtggtaact gattttaatg
1201 acaatcttat ttcaaatagg catttcaagt tggtgtattg catttgtcat ttgttgggca
1261 tgatgtcctg ttgtcttaat ccaattctat atgggtttct taataatggg attaaagctg
1321 atttagtgtc ccttatacac tgtcttcata tgtaataatt ctcactgttt
```

## 8. VIP

| | |
|---|---|
| LOCUS | VIP 1511 pb mRNA PRI 19-mar-1999 |
| DEFINICION | mRNA del péptido intestinal vasoactivo (VIP) de Homo sapiens. |
| ACCESO | NM_003381 |
| NID | g4507896 |
| VERSION | NM_003381.1 GI:4507896 |
| PALABRAS CLAVE | - |
| FUENTE | humana |

2516

| | |
|---|---|
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1511) |
| AUTORES | DeLamarter, J.F., Buell, G.N., Kawashima, E., Polak, J.M. y Bloom, S.R. |
| TITULO | Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in bacterial cells |
| REVISTA | Peptides 6 Supl. 1, 95-102 (1985) |
| MEDLINE | 86016352 |
| COMENTARIO | REFSEQ: Esta secuencia de referencia se derivó de M36634.<br>RefSeq PROVISIONAL: Es un registro de secuencia de referencia provisional que no ha sido sujeto todavía a revisión humana. El registro de secuencia de referencia refinado final puede ser algo diferente de este. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1511 |

```
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /map="6q24-q27"
                     /tissue_type="pancreatic tumor"
     gene            1..1511
                     /gene="VIP"
                     /db_xref="MIM:192320"
                     /db_xref="LocusID:7432"
     sig_peptide     67..129
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     CDS             67..579


                     /gene="VIP"
                     /codon_start=1
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
                     /protein_id="NP_003372.1"
                     /db_xref="PID:g4507897"
                     /db_xref="GI:4507897"
                     /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                     GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                     LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                     SPDFPEELEK"
     mat_peptide     307..387
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     mat_peptide     439..522
                     /product="vasoactive intestinal peptide"
     polyA_signal    1326..1331

RECUENTO DE BASES 541 a, 255 c, 276 g, 439 t

ORIGEN
```

```
   1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
  61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
 121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
 181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
 241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacacccct attatgatgt atccagaaat
 301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
 361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
 421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
 481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
 541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
 601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
 661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
 721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
 781 aatagtattt gagagttcta aattttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
 841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
 901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
 961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
1081 ataaaaagac attcttccaa aaagatttcc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1501 aaaaaaaaaa a
```

## 9. Receptor de VPAC1

| | |
|---|---|
| LOCUS | VIP 1511 pb mRNA PRI 19-mar-1999 |
| DEFINICION | mRNA del péptido intestinal vasoactivo (VIP) de Homo sapiens. |
| ACCESO | NM_003381 |
| NID | g4507896 |
| VERSION | NM_003381.1 GI:4507896 |
| PALABRAS CLAVE | - |

| | |
|---|---|
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1511) |
| AUTORES | DeLamarter, J.F., Buell, G.N., Kawashima, E., Polak, J.M. y Bloom, S.R. |
| TITULO | Vasoactive intestinal peptide: expression of the prohormone in bacterial cells |
| REVISTA | Peptides 6 Supl. 1, 95-102 (1985) |
| MEDLINE | 86016352 |
| COMENTARIO | REFSEQ: Esta secuencia de referencia se derivó de M36634.<br>RefSeq PROVISIONAL: Es un registro de secuencia de referencia provisional que no ha sido sujeto todavía a revisión humana. El registro de secuencia de referencia refinado final puede ser algo diferente de este. |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1511 |

2520

```
                    /organism="Homo sapiens"
                    /db_xref="taxon:9606"
                    /map="6q24-q27"
                    /tissue_type="pancreatic tumor"
gene                1..1511
                    /gene="VIP"
                    /db_xref="MIM:192320"
                    /db_xref="LocusID:7432"
sig_peptide         67..129
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
CDS                 67..579

                    /gene="VIP"
                    /codon_start=1
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
                    /protein_id="NP_003372.1"
                    /db_xref="PID:g4507897"
                    /db_xref="GI:4507897"
                    /translation="MDTRNKAQLLVLLTLLSVLFSQTSAWPLYRAPSALRLGDRIPFE
                    GANEPDQVSLKEDIDMLQNALAENDTPYYDVSRNARHADGVFTSDFSKLLGQLSAKKY
                    LESLMGKRVSSNISEDPVPVKRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILNGKRSSEGE
                    SPDFPEELEK"
mat_peptide         307..387
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
mat_peptide         439..522
                    /product="vasoactive intestinal peptide"
polyA_signal        1326..1331
```

RECUENTO DE BASES 541 a, 255 c, 276 g, 439 t

ORIGEN

```
   1 ggtcagctcc aaaacaatcc ggaacggcca gctccggggg agcacgactg ggcgagaggc
  61 acagaaatgg acaccagaaa taaggcccag ctccttgtgc tcctgactct tctcagtgtg
 121 ctcttctcac agacttcggc atggcctctt tacagggcac cttctgctct caggttgggt
 181 gacagaatac cctttgaggg agcaaatgaa cctgatcaag tttcattaaa agaagacatt
 241 gacatgttgc aaaatgcatt agctgaaaat gacacaccct attatgatgt atccagaaat
 301 gccaggcatg ctgatggagt tttcaccagt gacttcagta aactcttggg tcaactttct
 361 gccaaaaagt accttgagtc tcttatggga aaacgtgtta gcagtaacat ctcagaagac
 421 cctgtaccag tcaaacgtca ctcagatgca gtcttcactg acaactatac ccgccttaga
 481 aaacaaatgg ctgtaaagaa atatttgaac tcaattctga atggaaagag gagcagtgag
 541 ggagaatctc ccgactttcc agaagagtta gaaaaatgat gaaaaagacc tttggagcaa
 601 agctgatgac aacttcccag tgaattcttg aaggaaaatg atacgcaaca taattaaatt
 661 ttagattcta cataagtaat tcaagaaaac aacttcaata tccaaaccaa ataaaaatat
 721 tgtgttgtga atgttgtgat gtattctagc taatgtaata actgtgaagt ttacattgta
 781 aatagtattt gagagttcta aatttgtct ttaactcata aaaagcctgc aatttcatat
 841 gctgtatatc ctttctaaca aaaaaatata ttttaatgat aagtaatgct aggttaatcc
 901 aattatatga gacgtttttg gaagagtagt aatagagcaa aattgatgtg tttatttata
 961 gagtgtactt aactattcag gagagtagaa cagataatca gtgtgtctaa atttgaatgt
1021 taagcagatg gaatgctgtg ttaaataaac ctcaaaatgt ctaagatagt aacaatgaag
1081 ataaaaagac attcttccaa aaagattttc agaaaatatt atgtgtttcc atattttata
1141 ggcaaccttt atttttaatg gtgttttaaa aaatctcaaa tttggattgc taatcaccaa
1201 aggctctctc ctgatagtct ttcagttaag gagaacgacc cctgcttctg acactgaaac
1261 ttccctttct gcttgtgtta agtatgtgta aaatgtgaag tgaatgaaac actcagttgt
1321 tcaataataa atatttttgc cataatgact cagaatattg ctttggtcat atgagcttcc
1381 ttctgtgaaa tacattttgg agacacaact atttttccaa aataatttta agaaatcaaa
1441 gagagaaaat aaagaccttg cttatgattg cagataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1501 aaaaaaaaaa a
```

## 10. Receptor de VPAC2

| | |
|---|---|
| LOCUS | HUMHVRP 1640 pb mRNA PRI 16-feb-1995 |
| DEFINICION | mRNA del receptor de VIP con preferencia por helodermina humano (receptor VIP2/PACAP) |
| ACCESO | L36566 |
| NID | g550477 |
| VERSION | L36566.1 GI:550477 |

| | |
|---|---|
| PALABRAS CLAVE | Receptor de PACAP, receptor de VIP, receptor de VIP con preferencia por helodermina |
| FUENTE | humana |
| ORGANISMO | Homo sapiens<br>Eukaryota, Metazoa, Chordata, Craniata, Vertebrata, Mammalia, Eutheria, Primates, Catarrhini, Hominidae, Homo. |
| REFERENCIA | 1 (bases 1 a 1640) |
| AUTORES | Svoboda, M., Tastenoy, M., Van Rampelbergh, J., J., Goosens, J.F., De Neef, P., Waelbroeck, M., y Robberecht, P. |
| TITULO | Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts |
| REVISTA | Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (3), 1617-1624 (1994) |
| MEDLINE | 95110300 |
| CARACTERISTICAS | Localización/Cualificadores |
| source | 1..1640 |

```
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /cell_line="SUP T1 lymphoblast"
                     /clone_lib="lamda ZAP II"
     sig_peptide     163..231
                     /note="putative; putative"
     CDS             163..1479
                     /note="human VIP2 receptor was previously called
                     'helodermin-preferring VIP receptor'; transmembrane
                     domains are located at positions: 637-696; 772-844;
                     880-948; 1003-1071; 1147-1209; 1243-1302.; Potential
                     glycosylation sites are located at :334-336; 424-426;
                     436-438."
                     /codon_start=1
                     /function="VIP and PACAP receptor"
                     /protein_id="AAC37569.1"
                     /db_xref="PID:g550478"
                     /db_xref="GI:550478"
                     /translation="MRTLLPPALLTCWLLAPVNSIHPECRFHLEIQEEETKCTELLRS
                     QTEKHKACSGVWDNITCWRPANVGETVTVPCPKVFSNFYSKAGNISKNCTSDGWSETF
                     PDFVDACGYSDPEDESKITFYILVKAIYTLGYSVSLMSLATGSIILCLFRKLHCTRNY
                     IHLNLFLSFILRAISVLVKDDVLYSSSGTLHCPDQPSSWVGCKLSLVFLQYCIMANFF


                     WLLVEGLYLHTLLVAMLPPRRCFLAYLLIGWGLPTVCIGAWTAARLYLEDTGCWDTND
                     HSVPWWVIRIPILISIIVNFVLFISIIRILLQKLTSPDVGGNDQSQYKRLAKSTLLLI
                     PLFGVHYMVFAVFPISISSKYQILFELCLGSFQGLVVAVLYCFLNSEVQCELKRKWRS
                     RCPTPSASRDYRVCGSSFSHNGSEGALQFHRASRAQSFLQTETSVI"
     mat_peptide     232..1476
                     /function="VIP and PACAP receptor"
```

RECUENTO DE BASES 315 a, 512 c, 461 g, 352 t

2524

ORIGEN

```
   1 cgggacgagg gggcggcccc cgcgctcggg gcgctcggct acagctgcgg ggcccgaggt
  61 ctccgcgcac tcgctcccgg cccatgctgg aggcggcgga acccggggga cctaggacgg
 121 aggcggcggg cgctgggcgg cccccggcac gctgagctcg ggatgcggac gctgctgcct
 181 cccgcgctgc tgacctgctg gctgctcgcc cccgtgaaca gcattcaccc agaatgccga
 241 tttcatctgg aaatacagga ggaagaaaca aaatgtacag agcttctgag gtctcaaaca
 301 gaaaaacaca aagcctgcag tggcgtctgg gacaacatca cgtgctggcg gcctgccaat
 361 gtgggagaga ccgtcacggt gccctgccca aaagtcttca gcaattttta cagcaaagca
 421 ggaaacataa gcaaaaactg tacgagtgac ggatggtcag agacgttccc agatttcgtc
 481 gatgcctgtg gctacagcga cccggaggat gagagcaaga tcacgtttta tattctggtg
 541 aaggccattt ataccctggg ctacagtgtc tctctgatgt ctcttgcaac aggaagcata
 601 attctgtgcc tcttcaggaa gctgcactgc accaggaatt acatccacct gaacctgttc
 661 ctgtccttca tcctgagagc catctcagtg ctggtcaagg acgacgttct ctactccagc
 721 tctggcacgt tgcactgccc tgaccagcca tcctcctggg tgggctgcaa gctgagcctg
 781 gtcttcctgc agtactgcat catggccaac ttcttctggc tgctggtgga ggggctctac
 841 ctccacaccc tcctggtggc catgctcccc cctagaaggt gcttcctggc ctacctcctg
 901 atcggatggg gcctccccac cgtctgcatc ggtgcatgga ctgcggccag gctctactta
 961 gaagacaccg gttgctggga tacaaacgac cacagtgtgc cctggtgggt catacgaata
1021 ccgattttaa tttccatcat cgtcaatttt gtccttttca ttagtattat acgaattttg
1081 ctgcagaagt taacatcccc agatgtcggc ggcaacgacc agtctcagta caagaggctg
1141 gccaagtcca cgctcctgct tatcccgctg ttcggcgtcc actacatggt gtttgccgtg
1201 tttcccatca gcatctcctc caaataccag atactgtttg agctgtgcct cgggtcgttc
1261 cagggcctgg tggtggccgt cctctactgt ttcctgaaca gtgaggtgca gtgcgagctg
1321 aagcgaaaat ggcgaagccg gtgcccgacc ccgtccgcga gccgggatta cagggtctgc
1381 ggttcctcct tctcccacaa cggctcggag ggcgccctgc agttccaccg cgcgtcccga
1441 gcccagtcct tcctgcaaac ggagacctcg gtcatctagc cccacccctg cctgtcggac
1501 gcggcgggag gcccacggtt cggggcttct gcggggctga gacgccggct tcctccttcc
1561 agatgcccga gcaccgtgtc gggcaggtca gcgcggtcct gactccgtca agctggttgt
1621 ccactaaacc ccatacctgg
```

⑯ Los folios 2526 a 2528 son tarjetas de colores

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03084519 [illegible]     Folios: 2528
Fecha (RCB): 2003-11-07 17:36:12
Tramite : 032 PATENTES B   1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

AS 2525

tria y Comercio
RINTENDENCIA

# REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

**PATENTE DE INVENCIÓN [ ]** **MODELO DE UTILIDAD [ ]**

- Nombre e identificación del Solicitante 1 [ ]
- Nombre e identificación del Inventor 1 [ ]
- Título o nombre de la invención 1 [ ]
- Descripción [ ]
- Reivindicaciones 2474 2483. [ ]
- Resumen [ ]
- Comprobante de Pago 3 [ ]
- Poder, cuado proceda [ ]
- Copia de la primera solicitud de patente, si reivindica prioridad, señalándola expresamente [ ]
- Firma del solicitante o apoderado [ ]

COMPLETA [✓] INCOMPLETA [ ]

**DISEÑO INDUSTRIAL [ ]**

- Nombre e identificación del peticionario [ ]
- Nombre e identificación del inventor o diseñador [ ]
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse [ ]
- Representación gráfica [ ]
- Comprobante de pago [ ]
- Poder, cuado proceda [ ]
- Firma del solicitante o apoderado [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha:________________

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

MS 2516

**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

# INFORME DE PROTOCOLO

**Expediente** 00-84519

Fecha: 8 de Noviembre del 2000.

Se certifica que:

Desde 26 de julio de 1993,

del folio 72.160 al folio 72.165 del libro de Protocolo Nº 240, obra el poder Nº 14.575 conferido por PFIZER INC.

domiciliado(a) en New York, New York, E.U.A.

al doctor JAMES W.F. RAISBECK y/o ROBERT B. RAISBECK y/o ALVARO CORREA ORDOÑEZ.

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los mismos

Facultad para desistir y sustituir Si.

Revisado_________________________.

Ⓝ· los folios 2532.

2527

Industria y Comercio
RINTENDENCIA

# DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

## PRIMER EXAMEN DE FORMA

**EXPEDIENTE 00-84519**
Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

SI [x ]    NO [ ]    NO APLICABLE [ ] Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI [x ]    NO [ ]    NO APLICABLE [ ] Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI [x ]    NO [ ]    NO APLICABLE [ ] Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de Enero del 2000)

SI [x ]    NO [ ]    EXTEMPORANEAMENTE [ ] Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.

SI [x]    NO [ ]    NO APLICABLE [ ] Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI [x]    NO [ ]    NO APLICABLE [ ] Presentó la traducción del capitulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de Paris; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI [x]    NO [ ]    CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS

**OBSERVACIONES:**

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:
SI [x]    NO [ ]    Se ajusta a los aspectos FORMALES indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI [x]    NO [ ]    Se recomienda PUBLICAR el extracto correspondiente.

Bogotá, D.C., 8 de Noviembre del 2000

**EXAMINADOR JURIDICO.**
202022

**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

## 1º EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Radicación no 00-84519

Concepto Técnico no ______ Clasificación Internacional de Patentes A61K31/165

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 486 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención:**

SI [X] NO [ ] Contiene la identificación correcta del solicitante (Art.27-b).

SI [X] NO [ ] Contiene la identificación correcta del inventor (Artículo 27-e).

SI [X] NO [ ] Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención (Art.26-e).

SI [X] NO [ ] Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d).

SI [X] NO [ ] Contiene la descripción de la invención (Art.26-b).

SI [X] NO [ ] Contiene los dibujos correctos para comprender la invención (Art.26-d).

SI [X] NO [ ] Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c).

SI [ ] NO [ ] NO ES APLICABLE [✓] Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h).

SI [ ] NO [ ] NO ES APLICABLE [✓] Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afroamericanas o locales de los Países Miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-i).

SI [ ] NO [ ] NO ES APLICABLE [✓] Contiene el certificado de depósito del material biológico (Art.26-J).

SI [✓] NO [ ] La prioridad coincide con la materia reivindicada.

**SI [✓] NO [ ] CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI [✓] NO [X] ver hoja(s) anexa(s)

202012
EXAMINADOR TÉCNICO

Bogotá, D. C., 02 de enero de 2001

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

2529

## DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

**EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES**
en uso de sus facultades legales,

Doctor
Carlos R. Olarte
Apoderado

REF: Publicación
Patente de Invención
Radicación N° 00-84519
Auto N° 0111

**PRIMERO:** Que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para el efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la Decisión 486 la Comisión de la Comunidad Andina.

**SEGUNDO:** Que el solicitante hizo manifestación expresa pidiendo que la solicitud sea publicada a los dieciocho (18) meses contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud, esto es el día 07 de mayo del año 2002.

**DISPONE:**

**ARTICULO PRIMERO:** Enviar el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 23 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, teniendo en cuenta la oportunidad señalada.

**CUMPLASE.**

Dado en Bogotá, D.C., a los ________________________.

CLARA CASTELLANOS DE JAIMES,
Jefe de la División de Nuevas Creaciones (E)

Bogotá D.C., el extracto de esta solicitud fue publicado en el número de
fecha de la Gaceta de la Propiedad Industrial. El término hábil señalado por la ley
expiró el y SI____ NO____ se presentaron observaciones por parte de terceros.

/

2530

X

# *EXTRACTO PARA PUBLICACION*

# *SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION*

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

(21) No. SOLICITUD: 00-84519.

(51) INT. CL. A61K 31/165.

(22) FECHA DE PRESENTACION: X1-07-2000

(71) SOLICITANTE : PFIZER INC.

(30) PRIORIDAD:

(31) No. DE SOLICITUD: 9926437.6; 0004021.2, 0013001.3, 0016563.9, 0017141.3

(72) INVENTOR/ES : GRAHAM NIGEL MAW, CHRISTOPHER PETER WAYMAN.

(32) FECHA DE PRESENTACION: 08-11-99; 18-02-00, 26-05-00, 05-07-00; 12-07-00

(74) APODERADO: CARLOS R. OLARTE

(33) PAIS: UK; UK; UK, UK; UK.

(54) TITULO : COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA DISFUNCION SEXUAL FEMENINA.

(57) RESUMEN :

Una composición farmacéutica para uso (o cuando se utiliza) en el tratamiento de la FSD, preferiblemente FSAD, comprendiendo la composición farmacéutica un agente capaz de potenciar el cAMP en los genitales sexuales de una hembra que sufre FSD, preferiblemente FSAD, estando el agente opcionalmente mezclado con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; y siendo el citado agente un inhibidor de PDE (I : PDE), siendo la citada PDE una PDE hidrolizante de cAMP (y opcionalmente hidrolizante de cGMP).

2531

**REPUBLICA DE COLOMBIA**
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI**

Folio 2585

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER INC

| | | |
|---|---|---|
| REFERENCIA | Radicación No. | 00 84519 |
| | Trámite | 2 |
| | Evento | 1 |
| | Actuación | 416 |
| | Oficio No. | 1086 |
| | Folios | 1 |

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Siendo manifestación expresa del interesado de efectuar la publicación "inmediato", está se realizará en la próxima gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC, 14 AGO. 2006

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpa10