

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 244 416**

51 Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 5/50 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.01.2000** **PCT/US2000/00902**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2000** **WO00041546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2000** **E 00914425 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **15.05.2019** **EP 1140145**

54 Título: **Formulaciones novedosas de agonistas de la exendina y métodos de administración de los mismos**

30 Prioridad:

14.01.1999 US 116380 P

10.01.2000 US 175365 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
03.01.2020

73 Titular/es:

AMYLIN PHARMACEUTICALS, LLC (50.0%)

9360 Towne Centre Drive

San Diego, CA 92121, US y

ASTRAZENECA PHARMACEUTICALS LP (50.0%)

72 Inventor/es:

YOUNG, ANDREW;

L'ITALIEN, JAMES J. y

KOLTERMAN, ORVILLE

74 Agente/Representante:

GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro María

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 244 416 T5

DESCRIPCIÓN

Formulaciones novedosas de agonistas de la exendina y métodos de administración de los mismos

Campo de la invención

- 5 La presente invención está relacionada con formulaciones, dosificaciones y formas farmacéuticas novedosas de exendina que son bioactivas y administrables por las vías inyectables como por las no inyectables. Dichas formulaciones y dosificaciones y métodos de administración resultan útiles en el tratamiento de la diabetes, tanto de la diabetes de tipo I como la de tipo II, en el tratamiento de trastornos que podrían verse beneficiados por agentes que disminuyen el nivel de glucosa en plasma, y en el tratamiento de trastornos que podrían verse beneficiados por la administración de agentes eficaces en el retraso y/o disminución de la velocidad del vaciado gástrico o en la reducción del consumo de alimentos.

Antecedentes

- 15 La siguiente descripción incluye información que puede resultar útil para la comprensión de la presente invención. No significa la admisión de que cualquiera de las informaciones proporcionadas aquí son técnicas antecedentes de las invenciones reivindicadas en este momento, o pertinentes, ni de que cualquiera las publicaciones a las que se hace referencia específicamente o implícitamente son técnicas antecedentes.

- 20 Las exendinas son péptidos que se encuentran en las secreciones salivales del monstruo de Gila (*Gila monster*) (*Heloderma suspectum*) o el monstruo verde mejicano (*Mexican Beaded Lizard*) (*Heloderma horridum*), reptiles autóctonos de Arizona y del norte de México. La exendina-3 [SEQ. ID. NO.1: His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Ser-NH₂] se encuentra en las secreciones salivales del *Heloderma horridum* (monstruo verde mejicano), y la exendina-4 [SEQ. ID. NO.2: His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Ser-NH₂] se encuentra en las secreciones salivales del *Heloderma suspectum* (monstruo de Gila) (Eng, J., et al., *J. Biol. Chem.*, 265:20259-62, 1990; Eng, J., et al., *J. Biol. Chem.*, 267:7402-05, 1992). La secuencia de aminoácidos de la exendina-3 se presenta en la Figura 1. La secuencia de aminoácidos de la exendina-4 se presenta en la Figura 2. En un principio se creyó que la exendina-4 era un componente (potencialmente tóxico) del veneno. Ahora se sabe que carece de toxicidad y que en cambio se produce en las glándulas salivales del monstruo de Gila.

- 30 Las exendinas presentan una cierta similitud en la secuencia con varios miembros de la familia de los péptidos análogos al glucagón, siendo el mayor grado de homología, un 53%, con el GLP-1 [7 - 36] NH₂ [SEQ. ID. NO. 3] (Goke, et al., *J. Biol. Chem.*, 268:19650-55, 1993). El GLP-1 [7 - 36] NH₂ también se conoce como proglucagón [78 - 107], o simplemente GLP-1, el término que se va a emplear con más frecuencia aquí. El GLP-1 tiene un efecto insulínico, estimulando la secreción de insulina de las células β del páncreas. También se ha publicado que el GLP-1 inhibe la secreción de glucagón de las células α del páncreas (diameterrov, et al., *Diabetes*, 42:658-61, 1993; D'Alessio, et al., *J. Clin. Invest.*, 97:133-38, 1996). La secuencia de aminoácidos del GLP-1 se presenta en la Figura 3. Se ha publicado que el GLP-1 inhibe el vaciado gástrico (Willms B, et al., *J Clin Endocrinol Metab* 81 (1) : 327-32, 1996; Wettergren A, et al., *Dig Dis Sci* 38 (4) : 665-73, 1993), y la secreción del ácido gástrico (Schjoldager BT, et al., *Dig Dis Sci* 34 (5) : 703-8, 1989; O'Halloran DJ, et al., *J Endocrinol* 126 (1) : 169-73, 1990; Wettergren A, et al., *Dig Dis Sci* 38 (4) : 665-73, 1993). El GLP-1 [7 - 37], que presenta un residuo de glicina adicional en el extremo carboxílico, también estimula la secreción de insulina en humanos (diameterrov, et al., *Diabetes*, 42:658-61, 1993). Se ha publicado que una G-proteína transmembranosa receptora de la adenilato-ciclasa que se considera la responsable, al menos en parte, del efecto insulínico del GLP-1 se ha clonado a partir de una estirpe de células β (Thorens, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:8641-45, 1992).

- 45 Una parte importante de la investigación en los últimos años se ha centrado en el GLP-1 debido a las publicaciones sobre acciones tales como la amplificación de la producción de insulina estimulada (Byrne MM, Goke B. *Lessons from human studies with glucagon-like peptide-1: Potential of the gut hormone for clinical use* [Lecciones de estudios en humanos con el péptido-1 análogo al glucagón: potencial de la hormona digestiva para uso clínico]. En: Fehmann HC, Goke B. *Insulinotropic Gut Hormone Glucagon-Like Peptide 1*. Basel, Switzerland: Karger, 1997:219-33), la inhibición del vaciado gástrico (Wettergren A, et al., *Truncated GLP-1 (proglucagon 78 - 107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man* [El GLP-1 truncado (proglucagón 78 - 107 amida) inhibe las funciones pancreáticas y gástricas del ser humano], *Dis. Dis. Sci.* 1993 Abril; 38 (4) :665-73), la inhibición de la secreción de glucagón (Creutzfeldt WOC, et al., *Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I (7 - 36) amide in type I diabetic patients* [Acciones glucagonoestáticas y reducción de la hiperglucemia en ayunas mediante un péptido I amida (7 - 36) exógeno análogo al glucagón en diabéticos de tipo I], *Diabetes Care* 1996; 19 (6) :580-6), y una supuesta función en el control del apetito (Turton MD, et al., *A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding* [La función del péptido-1 análogo al glucagón en la regulación central de la alimentación], *Nature* 1996 Enero; 379 (6560) : 69-72). Se ha publicado que el GLP-1 también restablece la sensibilidad a la glucosa de los islotes en ratas viejas, restaurando su tolerancia a la glucosa hasta un nivel propio de ratas más jóvenes (Egan JM, et al., *Glucagon-like peptide-1 restores acute-phase insulin release to aged rats* [El péptido-1 análogo al glucagón restablece la liberación de insulina en la fase aguda en ratas

viejas], *Diabetología* 1997 Junio 40 (Suppl 1) :A130) . La corta duración de la acción biológica del GLP-1 *in vivo* es una de las características del péptido que ha dificultado su desarrollo como agente terapéutico.

Las investigaciones farmacológicas han demostrado tanto las similitudes como las diferencias entre la exendina-4 y el GLP-1. Se dice que la exendina-4 puede actuar en los receptores del GLP-1 de las células secretoras de insulina β TC1, en las células acinares dispersas del páncreas de conejillos de Indias, y en las células parietales del estómago. También se ha publicado que el péptido estimula la liberación de la somatostatina e inhibe la liberación de la gastrina en estómagos aislados (Goke, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:19650-55, 1993; Schepp, *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, 69:183-91, 1994; Eissele, *et al.*, *Life Sci.*, 55:629-34, 1994) . Se encontró que la exendina-3 y la exendina-4 estimulaban la producción de AMPc en las células acinares pancreáticas y la liberación de la amilasa de las mismas (Malhotra, R., *et al.*, *Regulator y Peptides*, 41:149-56, 1992; Raufman, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:21432-37, 1992; Singh, *et al.*, *Regul. Pept.* 53:47-59, 1994) . La exendina-4 también presenta una significativa mayor duración en su acción que el GLP-1. Por ejemplo, se publicó en un experimento que el descenso en el nivel de glucosa por la exendina-4 en ratones diabéticos persistía durante varias horas y, en función de la dosis, hasta 24 horas (Eng J. *Prolonged effect of exendin-4 on hyperglycemia of db/db mice* [Efectos prolongados de la exendina-4 en la hiperglucemia de ratones db/db], *Diabetes* 1996 Mayo; 45 (Suppl. 2):152A (sumario 554)). Basándose en sus actividades insulínótropas, se ha propuesto el uso de la exendina-3 y de la exendina-4 para el tratamiento de la diabetes mellitus y la prevención de la hiperglucemia (patente Eng, de Estados Unidos n.º 5.424.286).

Se ha publicado que los péptidos de exendina truncados en el C terminal tales como la exendina-4 [9 - 39], una molécula carboxiamidada, y los fragmentos desde el 3 - 39 hasta el 9 - 39 son antagonistas del GLP-1 potentes y selectivos (Goke, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268:19650-55, 1993; Raufman, J.P., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:2897-902, 1991; Schepp, W., *et al.*, *Eur. J. Pharm.* 269:183-91, 1994; Montrose-Rafizadeh, *et al.*, *Diabetes*, 45 (Suppl. 2): 152A, 1996). Se ha dicho que la exendina-4 [9 - 39] bloquea el GLP-1 endógeno *in vivo*, produciendo la reducción de la secreción de insulina (Wang, *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95:417-21, 1995; D'Alessio, *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 97:133-38, 1996). Se ha publicado la clonación, a partir de las células de los islotes pancreáticos de rata, de un receptor aparentemente responsable del efecto insulínótropo del GLP-1 en las ratas (Thorens, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:8641-8645, 1992). Se dice que las exendinas y la exendina-4 [9 - 39] se enlazan con el receptor del GLP-1 de rata clonado (el receptor del GLP-1 en las células β pancreáticas de rata (Fehmman HC, *et al.*, *Peptides* 15 (3) : 453-6, 1994) y el receptor del GLP-1 humano (Thorens B, *et al.*, *Diabetes* 42 (11) : 1678-82, 1993)) . En las células sometidas a transfección con el receptor del GLP-1 clonado, se dice que la exendina-4 es un agonista, es decir, aumenta el AMPc, mientras que se identifica la exendina [9 - 39] como antagonista, es decir, bloquea las acciones estimuladoras de la exendina-4 y del GLP-1. *Id.*

También se ha publicado que la exendina-4 [9 - 39] actúa como antagonista de las exendinas de longitud completa, inhibiendo la estimulación de las células acinares pancreáticas por la exendina-3 y la exendina-4 (Raufman, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:2897-902, 1991; Raufman, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:21432-37, 1992) . También se ha publicado que la exendina [9 - 39] inhibe la estimulación de los niveles de insulina en plasma por la exendina-4, e inhibe la actividad estimuladora de la liberación de la somatostatina y la actividad inhibidora de la liberación de la gastrina de la exendina-4 y del GLP-1. (Kolligs, F., *et al.*, *Diabetes*, 44:16-19, 1995; Eissele, *et al.*, *Life Sciences*, 55:629-34, 1994) . Se ha empleado la exendina [9 - 39] para investigar la relevancia del GLP-1 central en el control de la ingesta alimenticia (Turton, M.D. *et al Nature* 379:69-72, 1996) . El GLP-1 administrado por inyección intracerebro ventricular inhibe la ingesta alimenticia en las ratas. Se ha publicado que el efecto inductor de la saciedad del GLP-1 administrado ICV se inhibe con la inyección ICV de exendina [9 - 39] (Turton, *supra*) . Sin embargo, se ha publicado que el GLP-1 no inhibe la ingesta en ratones cuando se les administra mediante inyección periférica (Turton, M. D., *Nature*, 379:69-72, 1996; Bhavsar, S. P., *Soc. Neurosci. Abstr.* 21:460 (188.8), 1995).

Los resultados de una investigación sobre si las exendinas son las especies homólogas del GLP-1 de los mamíferos se publicó por Chen y Drucker quienes clonaron el gen de la exendina del monstruo de Gila (*J. Biol. Chem.* 272 (7):4108-15 (1997). La observación que el monstruo de Gila también presenta genes separados para los proglucagones (a partir de los que se procesa el GLP-1) , que son más similares al proglucagón de los mamíferos que la exendina, indica que las exendinas no son las especies homólogas del GLP-1.

Los agentes que sirven para retardar el vaciado gástrico han encontrado su lugar en la medicina como herramienta de diagnóstico en las exploraciones radiológicas gastrointestinales. Por ejemplo, el glucagón es una hormona polipeptídica que se produce en las células α de los islotes pancreáticos de Langerhans. Es un agente hiperglucémico que moviliza la glucosa activando la gluconeogénesis hepática. En un menor grado puede estimular la secreción de la insulina pancreática. El glucagón se utiliza en el tratamiento de la hipoglucemia inducida por la insulina, por ejemplo, cuando no resulta posible la administración de glucosa por vía intravenosa. Sin embargo, al reducir el glucagón la motilidad del tracto gastrointestinal también se emplea como herramienta de diagnóstico en las exploraciones radiológicas gastrointestinales. El glucagón también se ha empleado en varias investigaciones para tratar diversos trastornos gastrointestinales dolorosos relacionados con los espasmos. Daniel, *et. al.* (Br. Med. J., 3:720, 1974) informaron rápidamente de alivio sintomático de diverticulitis aguda en pacientes tratados con glucagón comparados con aquellos que habían sido tratados con analgésicos o antiespasmódicos. En una reseña de Glauser, *et al.* (*J. Am. Coll. Emergency Physns*, 8:228, 1979) se describe la liberación de una obstrucción alimenticia aguda en el esófago después del tratamiento con glucagón. En otro estudio, el glucagón alivió de manera

significativa el dolor en 21 pacientes enfermos de las vías biliares en comparación con los 22 pacientes tratados con un placebo (M. J. Stower, *et al.*, *Br. J. Surg.*, 69:591-2, 1982).

Los métodos para regular la motilidad gastrointestinal empleando agonistas de la amilina se describen en la solicitud internacional de propiedad conjunta n.º PCT/US 94/10225, publicada el 16 de marzo de 1995 como WO 95/07098.

5 Los métodos para regular la motilidad gastrointestinal empleando los agonistas de la exendina se describen en la patente de propiedad conjunta WO 98/0535, presentada el 8 de agosto de 1997 y titulada *Methods for Regulating Gastrointestinal Motility* (Métodos de regulación de la motilidad gastrointestinal), cuya solicitud es una continuación parcial de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 08/694.954 presentada el 8 de agosto de 1996.

10 Los métodos para reducir la ingesta alimenticia empleando agonistas de la exendina se describen en la patente de propiedad conjunta n.º WO 98/3023, presentada el 7 de enero de 1998 y titulada *Use of Exendin and Agonists Thereof for the Reduction of Food Intake* (Empleo de la exendina y de los antagonistas de la misma en la reducción de la ingesta alimenticia), que reivindica el beneficio de las solicitudes de patentes provisionales de Estados Unidos n.º 60/034.905 presentada el 7 de enero de 1997, n.º 60/055.404 presentada el 7 de agosto de 1997, n.º 60/065.442 presentada el 14 de noviembre de 1997 y n.º 60/066.029 presentada el 14 de noviembre de 1997.

15 También se ha publicado que las exendinas tienen efectos inotrópicos y diuréticos, tal como se establece en la solicitud internacional de propiedad conjunta n.º PCT/US 99/02554 (WO 99/40788) presentada el 5 de febrero de 1999, reivindicando el beneficio de la solicitud provisional n.º 60/075.122, presentada el 13 de febrero de 1998.

20 Se describen compuestos novedosos agonistas de la exendina en la solicitud PCT de propiedad conjunta n.º PCT/US98/16387 (WO 99/07404) presentada el 6 de agosto de 1998 titulada *Novel Exendin Agonist Compounds* (Compuestos novedosos antagonistas de la exendina), que reivindica el beneficio de la patente EE.UU. de n.º de solicitud 60/055.404, presentada el 8 de agosto de 1997.

25 Otros agonistas novedosos se describen en la PCT de propiedad conjunta n.º PCT/US98/24210 (WO 98/25727), presentada el 13 de noviembre de 1998, titulada *Novel Exendin Agonist Compounds* (Compuestos novedosos antagonistas de la exendina), que reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 60/055.442, presentada el 14 de noviembre de 1997.

Otros agonistas novedosos más se describen en la PCT de propiedad conjunta n.º PCT/US 98/24273, presentada el 13 de noviembre de 1998, titulada *Novel Exendin Agonist Compounds* (Compuestos novedosos antagonistas de la exendina), que reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 60/066.029, presentada el 14 de noviembre de 1997.

30 Desde la aparición de los primeros péptidos y proteínas terapéuticamente activos producidos por ingeniería genética, se ha producido una demanda creciente para encontrar otras rutas de administración distintas de la parenteral. Sin embargo, los intentos se han visto frustrados por las auténticas propiedades de los péptidos y de las proteínas que los destacan de las pequeñas moléculas de los principios activos empleados ampliamente hoy en día. Dichas propiedades comprenden el tamaño molecular, la susceptibilidad de degradación proteolítica, la rápida eliminación plasmática, las peculiares curvas dosis - respuesta, la inmunogenicidad, la biocompatibilidad, y la tendencia de los péptidos y de las proteínas a experimentar agregación, adsorción y desnaturalización.

35 Se comprende de una forma general que la administración de principios activos peptídicos por vías distintas a las inyecciones subcutáneas o intravenosas, o la venoclisis intravenosa, a menudo no resultan prácticas debido a, por ejemplo, en el caso de la administración oral, tanto a la degradación enzimática como a la falta de absorción en el tracto gastrointestinal. De ese modo, continúa existiendo la necesidad de desarrollar métodos alternativos a la inconveniente y a veces dolorosa inyección para la administración de principios activos peptídicos, tales como las exendinas y los análogos agonistas al péptido de la exendina a los que se ha hecho referencia anteriormente. Además de las formulaciones y dosificaciones útiles en la administración de exendinas y agonistas de las exendinas mediante una inyección, las formulaciones, las formas farmacéuticas, y los métodos que resuelven dichos problemas y que resultan útiles en la administración por vía distinta a la inyección de cantidades terapéuticamente efectivas de exendina y de agonistas de la exendina se describen aquí.

Sumario de la invención

50 De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona formulaciones de compuestos estables de exendina y dosificaciones de los mismos que presentan propiedades beneficiosas que comprenden los efectos de retardar el vaciado gástrico y la disminución de los niveles de glucosa en plasma.

Las formulaciones de exendina en el ámbito de la invención comprenden una forma farmacéutica líquida parenteral y modificaciones de la forma farmacéutica que son útiles en la administración oral, intranasal, bucal, sublingual, endotraqueal y pulmonar de las exendinas.

55 De ese modo, la invención incluye formas farmacéuticas líquidas parenterales que comprenden aproximadamente de un 0,005 % a un 0,4 %, más específicamente de un 0,005 % a un 0,02 %, o de un 0,005 % a un 0,05 % (p/v), del principio activo en un sistema acuoso junto con aproximadamente de un 0,02 % a un 0,5 % (p/v) de un acetato,

- fosfato, citrato o glutamato o un amortiguador similar tanto solo como en combinación para obtener un pH de la composición final desde un pH de 4,0 a un pH de 6,0 aproximadamente, o desde un pH de 4,0 a un pH de 5,0 aproximadamente, así como tanto de un 1,0 % a un 10 % aproximadamente (p/v) de un modificador de la iso-osmolalidad de hidrato de carbono o alcohol polihídrico (preferiblemente manitol) conduciendo a una solución isotónica o iso-osmolar en una fase continua acuosa. Aproximadamente se encuentra presente también del 0,005 % al 1,0 % (p/v) del conservante antibiótico m-cresol. Se añade una cantidad suficiente de agua para la inyección y así obtener la concentración deseada de la solución. También puede haber cloruro de sodio, así como otros excipientes, si así se desea. Dichos excipientes, sin embargo, han de mantener la estabilidad global del principio activo. Los alcoholes polihídricos útiles comprenden componentes tales como el sorbitol, el manitol, la glicerina y los polietilenglicoles (PEGs). Los alcoholes polihídricos y los hidratos de carbono también resultarán eficaces en la estabilización de las proteínas ante la desnaturalización provocada por las altas temperaturas y por los procesos de congelación - descongelación o de liofilización. Los hidratos de carbono adecuados comprenden la galactosa, la arabinosa, la lactosa o cualquier otro hidrato de carbono que no presente una reacción adversa en el paciente diabético, si está destinado para ese uso, es decir, que el hidrato de carbono no se metabolice de manera que forme altas concentraciones de glucosa en sangre. Preferiblemente, los péptidos de la presente invención se mezclan con alcoholes polihídricos tales como el sorbitol, el manitol, el inositol, la glicerina, el xilitol, y copolímeros del polipropileno/etilenglicol, así como varios polietilenglicoles (PEG) de un peso molecular de 200, 400, 1450, 3350, 4000, 6000, y 8000. El manitol es el alcohol polihídrico preferido.
- También se encuentran en el ámbito de la invención formas farmacéuticas preferidas para las exendinas cuando se administran mediante inyección, y cuando se administran por otras vías. De ese modo, las formulaciones para la exendina con una potencia comparable se proporcionan para su administración por inyección desde aproximadamente 0,1 µg hasta aproximadamente 0,5 µg por kilogramo, con una dosificación de una a tres veces al día. Por regla general, para el paciente diabético que pesa entre aproximadamente 70 kilogramos (promedio para el diabético tipo I) hasta aproximadamente 90 kilogramos (promedio para el diabético tipo II), por ejemplo, esto va a significar una administración de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 120 µg por día en una dosis única o de forma fraccionada, dichas dosis se administran preferiblemente dos o tres veces al día, y más preferiblemente, dos veces al día.
- En un procedimiento preferido de inyección la exendina se administra por vía parenteral, más preferiblemente por inyección, por ejemplo, mediante una inyección periférica. Preferiblemente, se administran al día de aproximadamente 1 µg-30 µg a 1 mg de exendina. Más preferiblemente, se administran al día de aproximadamente 1 µg-30 µg a aproximadamente 500 µg, o de aproximadamente 1 µg-30 µg a aproximadamente 50 µg de exendina. En la manera más preferible, se administran al día aproximadamente de 3 µg a aproximadamente 50 µg de exendina, en función del peso del paciente y la potencia del compuesto administrado. Las dosis preferidas que se basan en el peso del paciente para los compuestos con una potencia que corresponde aproximadamente a la de la exendina-4 varían desde aproximadamente 0,005 µg/kg hasta aproximadamente 0,2 µg/kg por dosis. Más preferiblemente, las dosis que se basan en el peso del paciente para los compuestos con una potencia que corresponde aproximadamente a la de la exendina-4 varían desde aproximadamente 0,02 µg/kg hasta aproximadamente 0,1 µg/kg por dosis. En la manera más preferible, las dosis que se basan en el peso del paciente para los compuestos con una potencia que corresponde aproximadamente a la de la exendina-4 varían desde aproximadamente 0,05 µg/kg hasta aproximadamente 0,1 µg/kg por dosis. Dichas dosis se administran de 1 a 4 veces al día, preferiblemente 1 o 2 veces al día. Las dosis de exendina habitualmente serán inferiores si se administran mediante venoclisis continua. Las dosis de exendina habitualmente serán superiores si se administran mediante métodos distintos a la inyección, tales como la administración oral, bucal, sublingual, intranasal, pulmonar o mediante un parche.
- Las formas farmacéuticas orales de acuerdo con la presente invención comprenderán desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 100 veces el principio activo, es decir, desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 12000 µg por día en una dosis única o en dosis fraccionada, preferiblemente desde aproximadamente 500 µg hasta aproximadamente 5000 µg por día. Las formas farmacéuticas pulmonares de acuerdo con la presente invención comprenderán desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100 veces el principio activo, es decir, desde aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 12000 µg por día en una dosis única o en dosis fraccionadas, preferiblemente desde aproximadamente 500 µg hasta aproximadamente 1000 µg por día. Las formas farmacéuticas intranasales, bucales y sublinguales de acuerdo con la presente invención comprenderán desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100 veces el principio activo, es decir, desde aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 12000 µg por día en una dosis única o en dosis fraccionadas.
- Las formas farmacéuticas preferidas de administración intranasal son de aproximadamente 10-1000 a aproximadamente 1200-12000 µg por día, en el caso de la administración bucal de aproximadamente 10-1000 a aproximadamente 1200-12000 µg por día, en el caso de la administración sublingual de aproximadamente 10-1000 a aproximadamente 1200-8000 µg por día. Las dosis sublinguales son preferiblemente más pequeñas que las dosis bucales.
- En otro aspecto preferido, la exendina empleada en los métodos de la presente invención es la exendina-3 [SEQ. ID. NO.1]. En otro aspecto preferido, dicha exendina es la exendina-4 [SEQ. ID. NO. 2].

Otras características y ventajas de la invención se pondrán de relieve a partir de la siguiente descripción de las formas de realización preferidas de la misma, así como a partir de las reivindicaciones.

De acuerdo con la presente invención y tal como se emplea aquí, los siguientes términos se encuentran definidos para tener los siguientes significados, excepto cuando se especifique lo contrario. Una sal farmacéuticamente aceptable comprende las sales de los compuestos de la presente invención derivados de la combinación de dichos compuesto y un ácido orgánico o inorgánico. En la práctica, el empleo de la forma farmacéutica como sal equivale al empleo de la forma básica. Los compuestos de la presente invención resultan útiles tanto en la forma básica libre como en la forma de sal, considerándose ambas formas como pertenecientes al ámbito de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa la secuencia de aminoácidos de la exendina-3 [SEQ. ID. NO.1].
 La Figura 2 representa la secuencia de aminoácidos de la exendina-4 [SEQ. ID. NO.2].
 La Figura 3 representa la secuencia de aminoácidos del GLP-1 [7 - 36] NH₂ (GLP-1) [SEQ. ID. NO.3].
 La Figura 4 representa los niveles en plasma de la exendina-4 en ratas después de administración endotraqueal.
 La Figura 5a representa la concentración en plasma de la exendina-4 después de la instilación en ratones db/db.
 La Figura 5b representa el efecto de la administración endotraqueal de la exendina-4 en la glucosa plasmática en ratones db/db.
 Las Figuras 6a y 6b representan el efecto de la administración endotraqueal de la exendina-4 en la glucosa plasmática en ratones ob/ob.
 La Figura 7a representa la concentración en plasma de exendina-4 después de la instilación endotraqueal en ratas.
 La Figura 7b representa la biodisponibilidad de la exendina-4 después de la instilación endotraqueal en ratas.
 La Figura 8 representa la concentración en plasma de exendina-4 en ratas expuestas a la exendina-4 aerosolizada.
 La Figura 9a representa el efecto de la exposición a la exendina-4 aerosolizada durante diez minutos en la glucosa plasmática en ratones db/db.
 La Figura 9b representa la concentración en plasma de exendina-4 después de la exposición a la exendina-4 aerosolizada durante diez minutos.
 La Figura 10 representa las concentraciones en plasma de la exendina-4 después de la administración intranasal en ratas.
 La Figura 11 representa el efecto de la administración intragástrica de la exendina-4 después en la glucosa plasmática en ratones db/db.
 La Figura 12a representa la concentración en plasma de la exendina-4 después de la administración sublingual en ratones db/db.
 La Figura 12b representa el efecto de la administración sublingual de exendina-4 en la glucosa plasmática en ratones db/db.
 La Figura 12c representa la concentración en plasma de la exendina-4 después de la administración sublingual en ratas.
 La Figura 12d representa la biodisponibilidad de la exendina-4 después de la administración sublingual.
 La Figura 12e representa la C_{máx} de exendina-4 sublingual.
 La Figura 13 representa el efecto de la exendina-4 (administrada i. p. dos veces al día) en la ingesta alimenticia (a), los cambios en el peso corporal (b) (peso corporal inicial 441 ± 39 g), o los cambios en la hemoglobina A_{1c} (7, 68 ± 0,20 % a las 0 semanas). Las dosis - respuestas (listas de la derecha) son para los promedios a lo largo de las últimas 2 de 6 semanas de tratamiento.
 La Figura 14 representa la concentración de glucosa plasmática (a) , el índice de venoclisis de glucosa requerido para mantener la euglucemia (b) y la concentración de lactato en plasma (c) en técnicas de clamp realizadas en ratas ZDF tratadas previamente durante 6 semanas con las dosis especificadas de exendina-4 (i. p. dos veces al día) . Las dosis - respuestas para los valores de venoclisis de glucosa y la concentración de lactato en plasma se basan en los valores promedio obtenidos entre 60 y 180 minutos de la técnica del clamp.
 Las Figuras 15 y 16 representan los resultados de la disminución de la glucosa a partir de la investigación clínica descrita en el Ejemplo 12.

Descripción detallada de la invención

Exendinas y agonistas de la exendina

La exendina-3 y la exendina-4 son péptidos naturales que se aíslan a partir de las secreciones salivares del monstruo de Gila y del monstruo verde mejicano. Los ensayos en animales con la exendina-4 han demostrado que su capacidad para disminuir el nivel de glucosa en sangre persiste durante varias horas. La exendina-4, un polipéptido de 39 aminoácidos, se sintetiza empleando una síntesis en fase sólida tal como se describe aquí, y se ha contrastado que este material sintético es idéntico a la exendina-4 natural.

Se han estudiado diversos aspectos de la farmacología no clínica de la exendina-4. En el cerebro, la exendina-4 se une principalmente al *area postrema* y a la región del núcleo del tracto solitario del romboencéfalo y al órgano

subfornical del prosencéfalo. Se ha observado la unión de la exendina-4 en el encéfalo y riñón en ratas y en ratones. Se desconoce a qué estructuras se une la exendina-4 en el riñón.

Un cierto número de otros experimentos han comparado las acciones biológicas de la exendina-4 y el GLP-1 y han demostrado una gama de propiedades más favorable para la exendina-4. Una dosis única subcutánea de exendina-4 disminuyó la glucosa plasmática en ratones db/db (diabéticos) y ob/ob (obesos diabéticos) hasta un 40 %. En las ratas ZDF (*Diabetic Fatty Zucker*), 5 semanas de tratamiento con exendina-4 disminuyeron la HbA_{1c} (una determinación de la hemoglobina glucosilada utilizada para evaluar los niveles de glucosa plasmática) hasta un 41%. La sensibilidad a la insulina también se vio mejorada en un 76 % después de 5 semanas de tratamiento de ratas obesas ZDF. En primates intolerantes a la glucosa también se observaron descensos dependientes de la dosis en la glucosa plasmática. Ver el Ejemplo 6, donde se describen los resultados de un experimento que indican que la exendina es más potente y/o efectiva que el GLP-1 al amplificar la liberación de insulina estimulada por la glucosa. El Ejemplo 8, además, describe el trabajo que demostró que la capacidad de la exendina-4 para disminuir el nivel de glucosa en vivo era 3430 veces más potente que la del GLP-1.

La acción insulínica de la exendina-4 también se ha observado en roedores, mejorando la respuesta de la insulina a la glucosa en más de un 100 % en ratas HSD (*Harlan Sprague Dawley*) sin ayunar, hasta aproximadamente unas 10 veces en ratones db/db sin ayunar. Un pretratamiento con concentraciones superiores de glucosa plasmática se relacionó con unos mayores efectos en la disminución de la glucosa. De ese modo, el efecto observado en la exendina-4 al hacer descender la glucosa parece ser dependiente de la glucosa, y mínimo si los animales ya presentan euglucemia. El tratamiento con la exendina-4 también está relacionado con la mejora en los índices de glucemia y la sensibilidad de la insulina, tal como se describe en los Ejemplos 9 y 13.

La exendina-4, en función de la dosis, disminuyó el vaciado gástrico en las ratas HSD y resultó ser aproximadamente 90 veces más potente que el GLP-1 para esta acción. También se ha demostrado que la exendina-4 reduce la ingesta alimenticia en los ratones NIH/Sw (suizos) después de la administración periférica, y resultó como mínimo 1000 veces más potente que el GLP-1 para esta acción. La exendina-4 redujo la concentración de glucagón en plasma en aproximadamente un 40 % en ratas ZDF anestesiadas bajo condiciones de clamp hiperinsulinémico e hiperglucémico, pero no afectó a las concentraciones de glucagón en ratas normales en condiciones de euglucemia, Ver Ejemplo 4. Se ha demostrado que la exendina-4, en función de la dosis, reduce el peso corporal en ratas ZDF obesas, mientras que en ratas ZDF delgadas, la disminución observada en el peso corporal parece ser transitoria.

Gracias a los efectos de aumentar y restaurar la secreción de insulina, así como de inhibir la secreción de glucagón, la exendina-4 será útil en pacientes con diabetes de tipo II que conserven la capacidad de secretar insulina. Sus efectos en la ingesta alimenticia, en el vaciado gástrico, en otros mecanismos que modulan la absorción de nutrientes, y en la secreción de glucagón también confirman la utilidad de la exendina-4 en el tratamiento de, por ejemplo, la obesidad, la diabetes de tipo I, y los pacientes con diabetes de tipo II que presentan una secreción disminuida de la insulina.

Se ha investigado la toxicología de la exendina-4 en estudios con dosis única en ratones, ratas, y monos, en estudios con dosis fraccionadas (hasta 28 dosis consecutivas diarias) en ratas y monos y en ensayos *in vitro* de acción mutágena y de alteraciones cromosómicas. Hasta la fecha, no se han producido fallecimientos, y no se han observado cambios relacionados con el tratamiento en la hematología, bioquímica, o cambios tisulares tanto macroscópicos como microscópicos. Se demostró que la exendina-4 no era mutágena, y que no provocaba aberraciones cromosómicas con las concentraciones empleadas en los ensayos (hasta 5000 µg/ml).

Apoyando la investigación de la farmacocinética y el metabolismo de la exendina-4, se ha desarrollado un cierto número de inmunoanálisis. En los estudios iniciales de farmacocinética se utilizó un radioinmunoanálisis con sensibilidad limitada (~100 pM). Posteriormente se validó un análisis inmunoradiométrico (IRMA) bilateral para la exendina-4 con un límite inferior de determinación cuantitativa de 15 pM. Ver ejemplos 5 y 7. Se encontró que la biodisponibilidad de la exendina-4, administrada por vía subcutánea, era aproximadamente del 50-80 % empleando el radioinmunoanálisis. Esto fue similar a lo visto después de la administración intraperitoneal (48-60 %). Las concentraciones máximas de plasma (C_{máx}) se produjeron entre 30 y 40 minutos (T_{máx}). Los valores de C_{máx} y AUC estaban relacionados monótonamente con la dosis. La vida media aparente de la exendina-4 administrada por vía subcutánea fue aproximadamente de 90-110 minutos. Este valor es significativamente superior a los 14 - 41 minutos observados después de la administración intravenosa. Unos resultados similares se obtuvieron mediante el análisis IRMA. Los estudios sobre la degradación con exendina-4 en comparación con el GLP-1 indican que la exendina-4 es relativamente resistente a la degradación.

Preparación de los compuestos

Los compuestos que constituyen los principios activos de las formulaciones y dosificaciones de la presente invención pueden prepararse empleando técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida y preferiblemente un sintetizador de péptidos automático o semiautomático. La preparación de la exendina-3 y de la exendina-4 se describe en los Ejemplos 1 y 2 más adelante. La preparación de los análogos peptídicos agonistas de la exendina se describe en los Ejemplos 13-198 más adelante.

Por regla general, el empleo de técnicas de síntesis de péptidos automáticas o semiautomáticas, se enlazan un aminoácido protegido por el grupo α -N-carbamoil y un aminoácido unido a la cadena peptídica en crecimiento, a una resina, a temperatura ambiente y en un disolvente inerte tal como la dimetilformamida, la N-metilpirrolidinona o el cloruro de metileno en presencia de agentes enlazantes tales como la diciclohexilcarbodiimida y el 1-hidroxibenzotriazol en presencia de una base tal como la diisopropiletilamina. El grupo protector α -N-carbamoil se elimina de la resina-péptido resultante empleando un reactivo tal como el ácido trifluoacético o la piperidina, y la reacción de enlace se repite con el siguiente aminoácido N-prottegido deseado para ser añadido a la cadena peptídica. Los grupos N-protectores adecuados son bien conocidos en la técnica, siendo los preferidos aquí el t-butiloxicarbonilo (tBoc) y el fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).

Los disolventes, los derivados de aminoácidos y la resina de 4-metilbenzhdрил-amina empleados en el sintetizador de péptidos pueden adquirirse en Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA). Los siguientes aminoácidos protegidos por cadena lateral pueden adquirirse en Applied Biosystems Inc.: Boc-Arg (Mts), Fmoc-Arg (Pmc), Boc-Thr (Bzl), Fmoc-Thr (t-Bu), Boc-Ser (Bzl), Fmoc-Ser (t-Bu), Boc-Tyr (BrZ), Fmoc-Tyr (t-Bu), Boc-Lys (Cl-Z), Fmoc-Lys (Boc), Boc-Glu (Bzl), Fmoc-Glu (t-Bu), Fmoc-His (Trt), Fmoc-Asn (Trt), y Fmoc-Gln (Trt). La Boc-His (BOM) puede adquirirse en Applied Biosystems, Inc. o en Bachem Inc. (Torrance, CA). El anisol, el sulfuro de dimetilo, el fenol, el etanoditiol, y el tioanisol pueden obtenerse en Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI). Air Products and Chemicals (Allentown, PA) suministra HF. El éter etílico, el ácido acético y el metanol pueden adquirirse en Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

La síntesis de péptidos en fase sólida puede llevarse a cabo en un sintetizador de péptidos automático (Modelo 430A, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) utilizando el sistema NMP/HOBt (opción 1) y la química del tBoc o del Fmoc (ver, *Applied Biosystems User's Manual* [Manual del usuario de biosistemas aplicados] para el sintetizador de péptidos ABI 430A, Versión 1.3B 1 de julio de 1988, sección 6, p. 49 - 70, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) con recubrimiento. El clivaje de las resinas peptídicas Boc puede realizarse con HF (-5 °C a 0 °C, 1 hora). El péptido puede extraerse de la resina alternando con agua y ácido acético, y liofilizando los filtrados. El clivaje de las resinas de péptido-Fmoc puede realizarse según los métodos estándar (*Introduction to Cleavage Techniques*, Applied Biosystems, Inc., 1990, p. 6 - 12). Los péptidos también pueden ensamblarse empleando un sintetizador Advanced Chem Tech Synthesizer (Modelo MPS 350, Louisville, Kentucky).

Los péptidos puede purificarse mediante RP-HPLC (de preparación y analítica) utilizando un sistema Waters Delta Prep 3000. Para aislar los péptidos puede emplearse una columna de preparación C4, C8 o C18 (10 μ , 2, 2 x 25 cm; Vydac, Hesperia, CA) y la pureza puede determinarse empleando una columna analítica C4, C8 o C18 (5 μ , 0, 46 x 25 cm; Vydac). Los disolventes (A = 0,1 % de TFA/agua y B = 0,1 % de TFA/CH₃CN) pueden llevarse a la columna analítica con un índice de flujo de 1,0 ml/min y a la columna de preparación a 15 ml/min. Los análisis de aminoácidos pueden realizarse en un sistema Waters Pico Tag y procesarse empleando el programa Maxima. Los péptidos pueden hidrolizarse mediante hidrólisis ácida en fase de vapor (115 °C, 20 - 24 h). Pueden derivarse los hidrolizados y analizarse mediante métodos estándar (Cohen, et al., *The Pico Tag Method: A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis* (El método Pico Tag: un manual de técnicas avanzadas para el análisis de aminoácidos), p. 11-52, Millipore Corporation, Milford, MA (1989)). El bombardeo de átomos rápidos puede llevarse a cabo mediante un M-Scan, Incorporated (West Chester, PA). La calibración de masa se puede realizar empleando yoduro de cesio o yoduro de cesio / glicerina. El análisis de ionización por desorción de plasma empleando la detección del tiempo de vuelo puede realizarse en un espectrómetro de masas Applied Biosystems Bio-Ion 20. La espectroscopia de masas por electroaspersión puede llevarse a cabo en una máquina VGTrío.

Los principios activos peptídicos útiles en las formulaciones y dosificaciones de la invención pueden también prepararse empleando técnicas de ADN recombinante, utilizando métodos actualmente conocidos en la especialidad. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Clonación molecular: manual de laboratorio), 2ª Ed., Cold Spring Harbor (1989).

Utilidad

Las formulaciones y dosificaciones descritas aquí son útiles teniendo en cuenta sus propiedades farmacológicas. En concreto, las formulaciones y dosificaciones de la invención son efectivas como exendinas y poseen actividad como agentes para disminuir el nivel glucosa en sangre, y para regular la motilidad gástrica y retardar el vaciado gástrico, tal como se pone de manifiesto por su capacidad de reducir los niveles de glucosa posprandial en los mamíferos.

Formulación y administración

Las formulaciones y dosificaciones de exendina de la presente invención son útiles a la vista de sus efectos análogos a la exendina, y pueden suministrarse convenientemente en la forma de formulaciones adecuadas para la administración parenteral (comprendiendo la intravenosa, intramuscular y subcutánea). También se describen aquí formulaciones y dosificaciones útiles en vías de administración alternativas, comprendiendo la oral, nasal, bucal, sublingual y pulmonar.

Los compuestos útiles en la invención pueden proporcionarse como composiciones parenterales para su inyección o venoclisis. Generalmente, pueden, por ejemplo, suspenderse en un aceite inerte, siendo adecuado un aceite vegetal tal como el aceite de sésamo, de cacahuete, de oliva o cualquier otro transportador aceptable. Preferiblemente, se

suspenden en un transportador acuoso, por ejemplo, en una solución amortiguadora isotónica a un pH de aproximadamente 4,0 a 6,0, y preferiblemente de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0. Dichas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden filtrarse en medio estéril. Las composiciones contienen sustancias auxiliares aceptables farmacéuticamente tal como se requiera para acercarse a las condiciones fisiológicas, comprendiendo los agentes amortiguadores del pH. Los amortiguadores útiles comprenden, por ejemplo, las disoluciones amortiguadoras de acetato de sodio / ácido acético. La isotonicidad puede conseguirse empleando cloruro de sodio u otros agentes aceptables farmacéuticamente tales como la glucosa, el ácido bórico, el tartrato de sodio, el propilenglicol, los polioles (como el manitol y el sorbitol) , u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro de sodio es el preferido especialmente para soluciones amortiguadoras que contienen iones de sodio.

Los compuestos de exendina también pueden formularse como sales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, sales de adición de ácidos) y/o complejos de los mismos. Son sales farmacéuticamente aceptables las sales atóxicas a la concentración a la que se administran. La preparación de dichas sales puede facilitar su uso farmacéutico alterando las características físico-químicas de la composición sin impedir que ésta ejerza su efecto fisiológico. Los ejemplos de alteraciones útiles de las propiedades físicas incluyen la disminución del punto de fusión para facilitar la administración transmucosa y el aumento de la solubilidad para facilitar la administración de mayores concentraciones del fármaco.

Las sales farmacéuticamente aceptables comprenden las sales de adición de ácidos tales como aquellas que contienen sulfato, hidrócloruro, fosfato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato, ciclohexilsulfamato y las sales de quinina. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse a partir de ácidos como el ácido hidróclórico, el ácido sulfúrico, el ácido fosfórico, el ácido sulfámico, el ácido acético, el ácido cítrico, el ácido láctico, el ácido tartárico, el ácido malónico, el ácido metanosulfónico, el ácido etanosulfónico, el ácido bencenosulfónico, el ácido *p*-toluenosulfónico, el ácido ciclohexilsulfámico, y el ácido de quinina. Dichas sales pueden prepararse, por ejemplo, haciendo reaccionar el ácido libre o las formas básicas del producto con uno o más equivalentes de la base o ácido apropiado en un disolvente o en un medio en el que la sal es insoluble, o en un disolvente como el agua que a continuación se elimina al vacío o por liofilización o mediante el intercambio de iones de una sal existente con otro ión o un ión en una resina de intercambio de iones adecuada.

Generalmente, también pueden utilizarse transportadores o excipientes para facilitar la administración de las dosificaciones de la presente invención. Los ejemplos de transportadores y excipientes comprenden el carbonato de calcio, el fosfato de calcio, diversos glúcidos como la lactosa, o tipos de almidón, derivados de la celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles y disolventes fisiológicamente compatibles.

Si así se desea, las soluciones de las composiciones de las anteriores dosificaciones pueden espesarse mediante un agente espesante tal como la metilcelulosa. Pueden prepararse en forma de emulsión, tanto de agua en aceite como de aceite en agua. Puede emplearse una amplia variedad de agentes emulsionantes farmacéuticamente aceptables que comprenden, por ejemplo, la goma arábiga, o un agente tensoactivo no iónico (tal como Tween), o un agente tensoactivo iónico (tal como los sulfatos o sulfonatos de alcohol poliéter alcalino, por ejemplo, Triton).

En general, las formulaciones y dosificaciones de la invención se preparan mezclando los ingredientes siguiendo procedimientos aceptados de forma general. Por ejemplo, los componentes seleccionados pueden simplemente mezclarse en una máquina mezcladora o en cualquier otro aparato estándar para producir una mezcla concentrada que puede ajustarse a la concentración y viscosidad finales mediante la adición de agua o de un agente espesante y posiblemente una solución amortiguadora para controlar el pH o un soluto adicional para controlar la tonicidad.

Otros transportadores farmacéuticamente aceptables y sus formulaciones se describen en los tratados normales de formulación farmacéutica, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Ciencia Farmacéutica de Remington) por E.W. Martin. Ver también Wang, Y.J. y Hanson, M.A. *Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers* (Formulaciones parenterales de proteínas y péptidos: estabilidad y estabilizadores), *Journal of Parenteral Science and Technology*, Informe técnico n.º 10, Supl. 42:2S (1988).

Para poder ser utilizados por el médico, los compuestos se suministraran en una forma farmacéutica que contiene una cierta cantidad de un agonista de la exendina, con o sin otro agente terapéutico, por ejemplo, un agente que disminuya el nivel de glucosa, un agente que module el vaciado gástrico, un agente que disminuya el nivel de lípidos, o un agente que inhiba la ingesta alimenticia. Las cantidades de un agonista de la exendina terapéuticamente efectivas para utilizar en el control del nivel de glucosa en sangre o en el control del vaciado gástrico y en condiciones en las que el vaciado gástrico se retarda o se regula beneficiosamente son aquellas que disminuyen los niveles posprandiales de glucosa en sangre en no más de 8 o 9 mM aproximadamente o aquellas que reducen los niveles de glucosa en sangre lo que se desea. En los pacientes diabéticos o que presentan intolerancia a la glucosa, los niveles de glucosa plasmática son superiores a los de los pacientes normales. En dichos pacientes puede obtenerse la reducción beneficiosa o alisamiento de los niveles posprandiales de glucosa en sangre. Tal como reconocerán los expertos en la materia, la cantidad efectiva de agente terapéutico variará en función de varios factores, entre ellos la condición física del paciente, el nivel de glúcidos en sangre o el grado de inhibición del vaciado gástrico que se ha de obtener, o el nivel deseado de reducción de la ingesta alimenticia, y de otros factores.

Dichas composiciones farmacéuticas son útiles para provocar un aumento de la sensibilidad a la insulina en un paciente y pueden emplearse también en trastornos, tales como la diabetes, en los que la sensibilidad a la insulina se ve aumentada de forma beneficiosa.

5 Una forma de preparación de liberación lenta a modo de depósito o almacén puede utilizarse de manera que las cantidades terapéuticamente efectivas de la preparación lleguen a la corriente sanguínea a lo largo de varias horas o días después de la inyección transdérmica u otra forma de administración.

10 Las dosis diarias efectivas de los compuestos están descritas. La dosis exacta a administrar la puede determinar el médico adjunto y más adelante puede depender de la eficacia del compuesto de exendina en concreto que se ha empleado, así como de la edad, el peso o la condición del paciente. La manera óptima de administración de los compuestos de la presente solicitud para un paciente depende de factores conocidos en la especialidad tales como una enfermedad o un trastorno en concreto, el efecto deseado, y el tipo de paciente. Mientras que los compuestos habitualmente se emplearán para tratar pacientes humanos, también pueden utilizarse para tratar enfermedades similares o idénticas en otros vertebrados tales como primates, animales de granja como los cerdos, ganado y aves de corral, y animales de caza y domésticos como caballos, perros y gatos.

15 La invención incluye formulaciones de las exendinas que comprenden una exendina mezclada con una solución amortiguadora (preferiblemente una solución amortiguadora de acetato), un modificador de la iso-osmolalidad (preferiblemente manitol), y que contiene un conservante (preferiblemente m-cresol), presentando dicha formulación un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,0 (preferiblemente entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,0).

20 La formulación que mejor soporta la forma farmacéutica líquida es una en la que el principio o principios activos son estables con la capacidad amortiguadora adecuada para mantener el pH de la solución en el tiempo deseado de durabilidad antes de la venta del producto. La forma farmacéutica ha de ser una solución isotónica y/o iso-osmolar para facilitar la estabilidad del principio activo o aliviar el dolor de la inyección o ambas cosas. Los aparatos que producen volúmenes de inyección muy pequeños, sin embargo, pueden no necesitar que la formulación sea isotónica y/o iso-osmolar. La forma farmacéutica se puede envasar como dosis unitaria o en un recipiente multiuso, incluyendo un conservante.

30 Dichas formas farmacéuticas incluyen de aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,4 %, más específicamente de aproximadamente un 0,005% a aproximadamente un 0,02 %, o de aproximadamente de un 0,005 % a aproximadamente un 0,05 % (p/v) , del principio activo en el sistema acuoso junto con aproximadamente del 0,02 % al 0,5 % (p/v) de acetato, fosfato, citrato o glutamato o un amortiguador similar, tanto solo como en combinación, para obtener un pH de la composición final de aproximadamente 3,0 a 7,0, más específicamente de un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,0, o de aproximadamente 4,0 a 5,0, así como aproximadamente de un 1,0 % a un 10 % (p/v) de un hidrato de carbono o de un alcohol polihídrico modificador de la iso-osmolalidad (preferiblemente manitol) o hasta un 0,9 % salino aproximadamente o una combinación de ambos conduciendo a una solución isotónica o una solución iso-osmolar en una fase continua acuosa. Se encuentra presente aproximadamente de un 0,005 % a un 1,0 % (p/v) de conservante antibiótico seleccionado entre el grupo que consiste en el m-cresol, el alcohol bencílico, el metilparabeno, el etilparabeno, el propilparabeno, el butilparabeno y el fenol. Se añade una cantidad suficiente de agua para la inyección a fin de obtener la concentración deseada de la solución. También puede encontrarse presente el cloruro de sodio, así como otros excipientes, si así se desea.

40 Dichos excipientes, sin embargo, han de mantener la estabilidad global del principio activo.

45 Los alcoholes polihídricos y los hidratos de carbono comparten los mismos elementos característicos en sus cadenas principales, es decir, -CHOH-CHOH-. Los alcoholes polihídricos. Los alcoholes polihídricos comprenden compuestos tales como el sorbitol, el manitol, la glicerina y los polietilenglicoles (PEGs) . Dichos compuestos son moléculas de cadena lineal como la manosa, la ribosa, la trehalosa, la maltosa, la glicerina, el inositol, la glucosa y la lactosa, por otro lado, son moléculas cíclicas que contienen un grupo ceto o un grupo aldehído. Dichas dos clases de compuestos también serán eficaces para estabilizar las proteínas frente a la desnaturalización provocada por las altas temperaturas y por los procesos de hielo - deshielo o de liofilización. Los hidratos de carbono adecuados comprenden la galactosa, la arabinosa, la lactosa o cualquier otro hidrato de carbono que no presente efectos adversos en el paciente diabético, es decir, que no se metabolice el hidrato de carbono de manera que forme grandes concentraciones de glucosa en la sangre. Dichos hidratos de carbono resultan bien conocidos en la especialidad como adecuados para los diabéticos.

50 Preferiblemente, los péptidos de la presente invención se mezclan con alcoholes polihídricos tales como el sorbitol, el manitol, el inositol, la glicerina, el xilitol, y copolímeros del polipropileno/etilenglicol, así como varios polietilenglicoles (PEG) de un peso molecular de 200, 400, 1450, 3350, 4000, 6000, y 8000) . El manitol es el alcohol polihídrico preferido.

60 La formulación líquida de la invención ha de ser sustancialmente isotónica y/o iso-osmolar. Una solución isotónica puede definirse como una solución que presenta una concentración de electrolitos, o un combinación de electrolitos y no electrolitos que ejercerá una presión osmótica como la de donde se introduce, aquí por ejemplo en el caso de la inyección parenteral de la formulación, el tejido de un mamífero. De una manera similar, una solución iso-osmolar puede definirse como una solución que presenta una concentración de no electrolitos que ejercerá una presión

osmótica equivalente a la de donde se introduce. Tal como se emplea aquí, sustancialmente isotónica significa dentro del ± 20 % de isotonicidad, preferiblemente dentro del ± 10 %. Por regla general, el producto formulado para la inyección se incluye en un recipiente, por ejemplo, un frasco, un cartucho, una jeringuilla precargada o un inyector de pluma desechable.

- 5 Las formulaciones que mejor soportan las formas farmacéuticas orales, intranasales, pulmonares o endotraqueales pueden ser formulaciones líquidas en conserva. Las formulaciones líquidas en conserva serán básicamente idénticas a las formulaciones descritas anteriormente como formulaciones parenterales líquidas en conserva. El pH de la solución ha de ser de aproximadamente 4,0 a 6,0, siendo el más preferido un pH superior o igual a aproximadamente 5,0 para reducir el potencial de broncoconstricción.

- 10 Las formulaciones que mejor soportan las formas farmacéuticas intranasales y/o endotraqueales pueden ser las formulaciones líquidas en conserva descritas previamente.

Para facilitar la administración bucal pueden utilizarse geles solubles o parches. Los geles pueden prepararse a partir de distintos tipos de derivados del almidón y/o de la celulosa.

- 15 Las mejores formas para la administración sublingual son las formulaciones líquidas similares a las descritas anteriormente como líquido parenteral, sin la necesidad de que la forma farmacéutica sea una solución isotónica y/o iso-osmolar,

La mejor forma para la administración oral es la formulación líquida (con cubierta de gelatina) que es similar a la formulación líquida parenteral excepto en el hecho de que la solución puede ser más concentrada y puede contener aditivos adicionales para facilitar su absorción en el intestino delgado.

- 20 La presente invención también comprende formas farmacéuticas preferidas para las exendinas cuando se administran por inyección, y cuando se administran por otras vías. De ese modo, las formulaciones para la exendina que presentan una potencia comparable se preparan para la administración mediante inyección e incluyen de 0,1 μg aproximadamente a 0,5 μg aproximadamente por kilogramo, administrándose de una a tres veces por día. Por regla general, para un paciente con diabetes que pesa entre unos 70 kilogramos (promedio para un diabético tipo I) y unos 90 kilogramos (promedio para un diabético tipo II), por ejemplo, esto va a significar una administración total de 10 μg aproximadamente a 120 μg aproximadamente por día en una dosis única o en dosis fraccionadas. Si se administra en dosis fraccionadas, las dosis se administran preferiblemente dos o tres veces al día, y más preferiblemente, dos veces al día.

- 30 En un procedimiento de inyección preferido, la exendina se administra por vía parenteral, más preferiblemente mediante inyección, por ejemplo, mediante una inyección periférica. Preferiblemente, se administran por día de aproximadamente 1 μg -30 μg hasta aproximadamente 1 mg de exendina. Más preferiblemente, se administran por día de aproximadamente 1 μg -30 μg hasta aproximadamente 500 μg , o de aproximadamente 1 μg -30 μg hasta aproximadamente 50 μg de exendina. Más preferiblemente, en función del peso del paciente y de la potencia del compuesto administrado, se administran por día de aproximadamente 3 μg hasta aproximadamente 50 μg de exendina. Las dosis que se basan en el peso del paciente para compuestos con aproximadamente la potencia de la exendina-4 varían desde aproximadamente 0,005 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por dosis hasta aproximadamente 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por dosis. Más preferiblemente, las dosis que se basan en el peso del paciente para compuestos con aproximadamente la potencia de la exendina-4 varían desde aproximadamente 0,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por dosis hasta aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por dosis. En la manera más preferida, las dosis que se basan en el peso del paciente para compuestos con aproximadamente la potencia de la exendina-4 varían desde aproximadamente 0,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por dosis hasta aproximadamente 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por dosis. Dichas dosis se administran de 1 a 4 veces por día, preferiblemente de unas 2 veces por día. Las dosis de las exendinas normalmente serán inferiores si se administran por venoclisis continua. Las dosis de las exendinas serán habitualmente superiores si se administran por métodos distintos a la inyección, tales como la administración oral, bucal, sublingual, intranasal, pulmonar o mediante un parche.

- 45 Las formas farmacéuticas orales según la presente invención incluirán de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 veces el principio activo, es decir, desde aproximadamente 500 μg hasta aproximadamente 12000 μg por día en una dosis única o en dosis fraccionadas, preferiblemente desde aproximadamente 500 μg hasta aproximadamente 5000 μg por día. Las formas farmacéuticas pulmonares según la presente invención incluirán de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 veces el principio activo, es decir, desde aproximadamente 100 μg hasta aproximadamente 12000 μg por día en una dosis única o en dosis fraccionadas, preferiblemente desde aproximadamente 500 μg hasta aproximadamente 1000 μg por día. Las formas farmacéuticas intranasales, bucales y sublinguales según la presente invención también incluirán de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 veces el principio activo, es decir, desde aproximadamente 100 μg hasta aproximadamente 12000 μg por día en una dosis única o en dosis fraccionadas.

- 55 Las formas farmacéuticas para la administración intranasal son de aproximadamente 10-1000 μg hasta aproximadamente 1200-12000 μg por día, para la administración bucal de aproximadamente 10-1000 μg hasta aproximadamente 1200-12000 μg por día, y para la administración sublingual de aproximadamente 10-1000 μg hasta aproximadamente 1200-8000 μg por día. Las formas farmacéuticas sublinguales son preferiblemente más pequeñas que las formas farmacéuticas bucales.

Estudios clínicos

Tal como se describe en el Ejemplo 10 más adelante, se ha realizado un estudio en voluntarios sanos con doble anonimato, con dosis única controlada con placebo, para examinar la seguridad, la tolerabilidad, y la farmacocinética de la exendina-4 subcutánea. Se estudiaron cinco dosis únicas subcutáneas de exendina-4 (0,01, 0,05, 0,1, 0,2 o 0,3 µg/kg) en 40 voluntarios varones sanos en ayunas. Las concentraciones máximas de exendina-4 en plasma se alcanzaron entre una y dos horas después de la administración con pequeñas diferencias entre las dosis examinadas. El examen de los datos indicó un aumento de $C_{\text{máx}}$ en función de la dosis. No se presentaron reacciones adversas importantes en este estudio.

Los voluntarios varones sanos que participaron en dicho estudio toleraron bien las dosis subcutáneas de exendina-4 hasta 0,1 µg/kg inclusive. Con esta dosis también se observó un descenso de la concentración de glucosa plasmática. Con las dosis de 0,2 µg/kg y superiores, los reacciones adversas observadas con mayor frecuencia fueron cefaleas, náuseas, vómitos, mareos e hipotensión ortostática. Se produjo un descenso transitorio en la concentración de glucosa plasmática después de la administración de dosis de 0,05 µg/kg y superiores.

El Ejemplo 12 de más adelante describe un estudio posterior de la relación entre la dosis y la respuesta para el efecto de la exendina-4 en la disminución de la glucosa a dosis inferiores a los 0,1 µg/kg. Catorce pacientes [edad media ($\pm$ DT (desviación típica)) 55 ± 2 ; media de IMC (índice de masa corporal) ($30,2 \pm 1,6 \text{ kg/m}^2$)] con diabetes tipo II tratados con un régimen y/o agentes hipoglucémicos se estudiaron después de que se les retiraran los agentes orales por un período de 10 - 14 días. Se realizaron valoraciones después de inyecciones subcutáneas de placebo distribuidas al azar, 0,01, 0,02, 0,05 y 0,1 µg/kg de exendina-4 en días distintos después de ayunar durante la noche. Las inyecciones se administraron inmediatamente antes de la ingestión de una comida estandarizada Sustacal® (7 kcal/kg) y a continuación se recogieron muestras de glucosa plasmática a intervalos frecuentes durante los 300 minutos posteriores.

La respuesta glucémica se cuantificó como una media ponderada con el tiempo ($\pm$ DT) del cambio de la concentración de glucosa plasmática durante un período de 5 horas. La respuesta varió de un incremento de $+ 42,0 \pm 7,9 \text{ mg/dl}$ por encima de la concentración de glucosa en ayunas con el placebo en comparación con una disminución de $30,5 \pm 8,6 \text{ mg/dl}$ por debajo de la concentración de glucosa en ayunas con 0,1 µg/kg de exendina-4.

La DE_{50} (dosis efectiva para el 50 % de los pacientes) para este efecto de disminución de la glucosa fue de 0,038 µg/kg. Resultó que las dosis de exendina-4 menores de 0,1 µg/kg disociaban los efectos en la disminución de la glucosa de las reacciones adversas gastrointestinales. El Ejemplo 12 muestra cómo la exendina-4 no solamente se tolera bien a dosis inferiores a los 0,1 µg/kg, sino que dichas dosis disminuyeron considerablemente las concentraciones posprandiales de glucosa plasmática (DE_{50} de 0,038 µg/kg) en pacientes con diabetes tipo II.

Vías alternativas de administración

La viabilidad de las vías alternativas de administración para la exendina-4 se han explorado determinando el nivel de exendina-4 en la circulación junto con la observación de la respuesta biológica, tal como la disminución de la glucosa plasmática en animales diabéticos, después de su administración. Se ha investigado el tránsito de la exendina-4 a través de varias superficies, el tracto respiratorio (por las vías intranasal, endotraqueal y pulmonar) y digestivo (por la vía sublingual, mediante sonda nasogástrica, y por la vía intraduodenal). Los efectos biológicos y la aparición de la exendina-4 en sangre se han observado con cada vía de administración del tracto respiratorio y por la vía sublingual y la sonda nasogástrica en el tracto gastrointestinal.

Administración endotraqueal - Tal como se describe aquí, la administración endotraqueal de la exendina-4 en ratas en ayunas (20 µg/50 µl/animal) provocó el aumento de la concentración media de exendina-4 en plasma hasta $2060 \pm 960 \text{ pg/ml}$ en los 5 - 10 minutos que siguieron a la administración. Las concentraciones elevadas de exendina-4 en plasma se mantuvieron por lo menos durante 1 hora después de la instilación (ver Figura 4). En ratones diabético *db/db*, la instilación endotraqueal de exendina-4 (1 µg/animal) disminuyó la concentración de glucosa plasmática en un 30 % mientras que en el grupo de control aumentó en un 41 % 1,5 horas después del tratamiento. En dichos animales la concentración plasmática media era de $777 \pm 365 \text{ pg/ml}$ al cabo de 4,5 horas después del tratamiento (ver Figuras 5a y 5b)

En ratones diabéticos *ob/ob*, la instilación de la exendina-4 (1 µg/animal) disminuyó la concentración de glucosa plasmática hasta un 43 % con respecto al nivel del pre-tratamiento después de 4 horas mientras que en el grupo de control no cambió (ver Figuras 6a y 6b).

Nueve machos de rata Sprague Dawley (edad 96 - 115 días, peso 365 - 395, media 385 g) después de ayunar durante la noche fueron anestesiados con halotano, se les practicó una traqueotomía, y se les implantó un catéter en la arteria femoral. En el minuto $t = 0$, se instiló en la tráquea más allá del nivel de instilación 30 µl de solución salina en la que se había disuelto 2, 1 µg ($n = 3$), 21 µg ($n = 3$) o 210 µg de exendina-4. Se tomaron muestras de sangre después de 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 y 360 minutos, se centrifugó y se almacenó el plasma a -20°C para un posterior ensayo inmunoradiométrico (IRMA) dirigido a los epítomos N-terminal y C-terminal de la molécula intacta de exendina-4. En los 5 minutos que siguieron a la administración endotraqueal, se observó una concentración plasmática máxima del 61-74 %. La $T_{\text{máx}}$ tuvo lugar entre 20 y 30 minutos después de la administración. La AUC y la $C_{\text{máx}}$ fueron proporcionales a la dosis. A una dosis de 2,1 µg (1,5 nmol/kg), produciendo

unas concentraciones plasmática resultantes de ~ 50 pM (donde se observan los efectos de disminución de glucosa en humanos), la biodisponibilidad era de un 7,3 %. El coeficiente de variación fue de un 44 %. A dosis mayores, la biodisponibilidad fue ligeramente menor, y el CV fue superior (ver Figuras 7a y 7b). Mediante la administración endotraqueal, el t (definido pragmáticamente como el tiempo que tarda el plasma en situarse por debajo del 50 % de la $C_{\text{máx}}$) fue de 30-60 minutos para la dosis menor y de 60-90 minutos para las 2 dosis mayores. En resumen, las cantidades biológicamente eficaces de exendina-4 se absorben rápidamente por la vía endotraqueal sin provocar ninguna molestia respiratoria aparente. El tracto respiratorio es una vía de administración de exendina-4 viable.

Administración pulmonar - Se detectaron concentraciones elevadas de exendina-4 en plasma en ratas expuestas a la exendina-4 aerosolizada. La exposición de las ratas a aproximadamente 8 ng de exendina-4 por ml de atmósfera durante 10 minutos produjo una concentración máxima de exendina-4 en plasma de 399 - 1900 pg/ml 5 minutos después del tratamiento (ver Figura 8) . Una exposición similar en ratones diabéticos *db/db* a la exendina-4 aerosolizada produjo un 33 % de descenso en la glucosa plasmática después de 1 hora, cuando se detectó una media de concentración de exendina-4 en plasma de 170 ± 67 pg/ml. Los ratones diabéticos *db/db* en el grupo de control expuesto a la solución salina aerosolizada no presentaron cambios en la glucosa plasmática (ver Figuras 9a y 9b)

Administración intranasal - La aplicación de la exendina-4 en las fosas nasales produjo una elevación en las concentraciones plasmáticas. Se detectaron unos valores máximos de 300 pg/ml y de 6757 pg/ml 10 minutos después de la administración de 1 μg y de 100 μg de exendina-4 (disueltos en 2 μl de solución salina) respectivamente (ver Figura 10).

Administración por el tubo digestivo - Se mantuvo en ayunas unos machos de ratones *db/db* (de aproximadamente 50 g de peso corporal) durante 2 horas y antes y después de la administración intragástrica de solución salina o exendina-4. Se observó un descenso en la concentración de glucosa plasmática del 9 % con 1 mg/200 μl /animal y se observó un descenso del 15 % con 3 mg/200 μl /animal, en comparación con un aumento de la glucosa plasmática del 10 % en los controles una hora después del tratamiento (ver Figura 11).

Administración sublingual - La aplicación sublingual de exendina-4 (100 μg /5 μl /animal) a ratones diabéticos *db/db* produjo un descenso de la concentración de glucosa plasmática de un 15 % una hora después del tratamiento. Se observó un aumento del 30 % en el grupo de control al que se administró la solución salina. El nivel medio de exendina-4 en plasma al cabo de 60 minutos fue de 4520 ± 1846 pg/ml (ver Figuras 12a, 12 b y 12c).

Se anestesiaron con metofano durante un corto espacio de tiempo ocho ratas Sprague Dawley (~ 300 g) mientras se les aplicaba bajo la lengua con la pipeta una solución con 10 μg /3 μl ($n = 4$) o 100 μg / μl ($n = 4$). Posteriormente se realizó la extracción de muestras de sangre desde la cola, anestesiada por vía tópica, y se analizaron para la exendina-4 mediante un IRMA. Las concentraciones en plasma empezaron a aumentar a los 3 minutos después de la administración y alcanzó el valor máximo 10 minutos y 30 minutos después de la administración (con las dosis de 10 μg y 100 μg respectivamente). La concentración de exendina-4 en plasma posteriormente permaneció por encima del límite inferior de determinación cuantitativa (LLOQ) pasadas 5 horas. El área definida por la curva al final de cada experimento se calculó por el método trapezoidal. Se derivaron dos números, uno a partir de la inmunorreactividad total, el otro a partir del incremento por encima del valor distinto de cero presente a $t = 0$. Dichos valores se compararon con el histórico de datos de las inyecciones intravenosas rápidas (emboladas) en el mismo modelo animal para obtener, respectivamente, estimaciones altas y bajas de la biodisponibilidad. Para la dosis de 10 μg , la biodisponibilidad sublingual fue del 3, 1 - 9,6 %, y para la dosis de 100 μg , la biodisponibilidad fue de 1, 3 - 1, 5 %. La variabilidad de la AUC fue mayor durante la primera hora después de la administración (CV 74 % y 128 % para las dosis de 10 μg y 100 μg). Para la integral de 5 horas, el coeficiente de variación de la AUC fue de un 20 % y un 64 %, respectivamente. La concentración máxima en plasma $C_{\text{máx}}$ tuvo lugar rápidamente después de la administración sublingual y después de la administración subcutánea ($T_{\text{máx}} \sim 30$ minutos). La $C_{\text{máx}}$ después de la administración sublingual de 10 μg de exendina 4 fue del 1,5 % respecto a la obtenida después de la embolada intravenosa, pero de un 14,5 % de la obtenida después de la embolada subcutánea. La $C_{\text{máx}}$ después de la administración sublingual de 100 μg de exendina-4 fue solamente del 0, 29 % respecto a la observada después de la embolada intravenosa, y de un 6,1 % de la obtenida después de la embolada subcutánea (ver Figuras 12d y 12e). De ese modo, la exendina-4 puede administrarse en dosis bioefectivas por la vía sublingual. La biodisponibilidad y la $C_{\text{máx}}$ fueron mayores, el $T_{\text{máx}}$ fue más corto y la variabilidad de la disponibilidad fue menor con la dosis sublingual menor. La dosis sublingual menor produjo concentraciones en plasma similares a las que se pronostican como efectivas para disminuir el nivel de glucosa en los humanos (~ 50 -100 pM).

Para ayudar a la comprensión de la presente invención se incluyen los siguientes Ejemplos que describen los resultados de una serie de experimentos. Los experimentos relacionados con la presente invención, por supuesto, no deben interpretarse como específicamente restrictivos de la invención y las variaciones de la invención, desconocidas o que se desarrollen posteriormente, que pueden encontrarse en el campo de los especialistas, se considera que caen en el ámbito de la invención tal como se describe aquí y tal como se reivindica a continuación.

EJEMPLO 1 - PREPARACIÓN DE LA EXENDINA-3

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu
 Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly
 Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser-NH₂ [SEQ. ID. NO. 1]

El anterior péptido amidado se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmol/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.). En general, se utilizaron ciclos de enlace único durante todo el proceso de síntesis y se utilizó una bioquímica Fast Moc (activación HBTU). La desprotección (eliminación del grupo Fmoc) de la cadena peptídica en crecimiento se consiguió empleando piperidina. La desprotección final de la resina peptídica completa se consiguió utilizando una mezcla de trietilsilano (0,2 ml), etanoditol (0,2 ml), anisol (0,2 ml), agua (0,2 ml) y ácido trifluoroacético (15 ml) siguiendo métodos estándar (*Introduction to Cleavage Techniques*, Applied Biosystems, Inc.). El péptido se precipitó en éter/agua (50 ml) y se centrifugó. Se reconstituyó el precipitado en ácido acético glacial y se liofilizó. El péptido liofilizado se disolvió en agua. La tasa bruta de pureza fue del 75 % aproximadamente.

En las etapas de purificación y análisis de los Ejemplos 1 y 2 se utilizaron el Disolvente A (0,1 % de TFA en agua) y el Disolvente B (0,1 % de TFA en ACN).

La solución que contenía el péptido se aplicó a una columna de preparación C-18 y se purificó (del 10 % al 40 % de Disolvente B en el Disolvente A durante unos 40 minutos). La pureza de las fracciones se determinó isocráticamente empleando la columna analítica C-18. Las fracciones puras se juntaron proporcionando el péptido anteriormente identificado. La analítica mediante RP-HPLC (gradiente del 30 % al 60 % de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) de péptido liofilizado proporcionó un producto peptídico con un período de retención observado de 19,2 minutos.

EJEMPLO 2 - PREPARACIÓN DE LA EXENDINA-4

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu
 Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly
 Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser-NH₂ [SEQ. ID. NO. 2]

El anterior péptido amidado se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmol/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó el clivaje de la resina, se desprotegió y se purificó de manera similar a la que se ha descrito en el Ejemplo 1 en relación con la Exendina-3. En los análisis se utilizaron el Disolvente A (0,1 % de TFA en agua) y el Disolvente B (0,1 % de TFA en ACN). La analítica mediante RP-HPLC (gradiente del 36 % al 46 % de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) de péptido liofilizado proporcionó un producto peptídico con un período de retención observado de 14, 9 minutos. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4186,6; encontrado 8186,0 a 4186,8 (cuatro lotes).

EJEMPLO 3 - LA EXENDINA-4 ES UN PÉPTIDO CIRCULANTE ALIMENTICIO EN EL MONSTRUO DE GILA

En el presente experimento se investigó si la exendina-4 juega un papel en el metabolismo del propio monstruo de Gila. Para investigar si la exendina-4 aparecía en la sangre del monstruo de Gila como respuesta a la alimentación, se tomaron muestras de sangre de un animal sometido a ayuno durante 7 semana, antes y 30 minutos después de la ingestión de una rata pequeña. Se analizó la exendina-4 completa en el plasma utilizando un análisis inmunoradiométrico con parejas de anticuerpos monoclonales dirigidos a los epítomos de los extremos N- y C- de la exendina-4. La concentración de exendina-4 en el plasma en ayunas fue de 76 pg/ml, cerca del límite inferior de la determinación cuantitativa. Después de comer, este valor se elevó 300 veces hasta 23120 pg/ml.

En un segundo experimento, se tomaron muestras sucesivas de dos animales sometidos a ayuno durante cinco semanas antes y después de la ingestión de una o dos ratas pequeñas (47 - 49 g). La concentración de exendina-4 en el plasma se elevó de 23 a 36 veces (hasta 4860, 8340 pg/ml) inmediatamente después de comer, concordando con el pase directo de la exendina-4 de las glándulas salivales a la sangre. Después de comer una segunda rata (t = 30 minutos), la concentración de exendina-4 en el plasma se elevó aún más hasta 27209 pg/ml. La concentración de exendina-4 en el plasma disminuyó con un t de 5, 00 y 5, 33 horas, respectivamente. En conclusión, la exendina-4, de la que se sabe que se origina en las glándulas salivales del monstruo de Gila, aparece en concentraciones elevadas en la sangre inmediatamente después de comer. Esto puede representar una señal alimenticia para inhibir más alimentación y estimular el almacenaje de nutrientes.

EJEMPLO 4 - LA EXENDINA-4 DISMINUYE LA SECRECIÓN DE GLUCAGÓN DURANTE LOS CLAMPS HIPERGLUCÉMICOS EN LAS DIABETIC FATTY ZUCKER RATS (RATAS OBESAS DIABÉTICAS DE ZUCKER)

La hiperglucemia absoluta o relativa es con frecuencia una característica de la *diabetes mellitus* tipo I y tipo II, y la supresión de la secreción excesiva de glucagón es una ayuda potencial en una terapia que emplee agentes glucagonostáticos. En el presente Ejemplo, se examinó el efecto de la exendina-4 en la secreción del glucagón en machos de ratas anestesiadas del tipo *Diabetic Fatty Zucker* (ZDF). Al utilizar un protocolo de clamp hiperglucémico hiperinsulinémico, se mantuvieron constantes los factores que tienden a influir en la secreción del glucagón. Se realizó el clamp de la glucosa a ~ 34 mM 60 minutos antes de empezar la venoclisis intravenosa de solución salina ($n = 7$) o exendina-4 ($0, 21 \mu\text{g} + 2,1 \mu\text{g/ml/h}$; $n = 7$). La concentración de glucagón en el plasma se determinó antes de dichas venoclisis y fue similar en ambos grupos (306 ± 30 pM *versus* 252 ± 32 pM respectivamente; n. e.).

La concentración media de glucagón en plasma en las ratas a las que se realizó la venoclisis con exendina-4 fue de aproximadamente la mitad de la de las ratas a las que se realizó la venoclisis con la solución salina en los 60 minutos finales del clamp (165 ± 18 pM *versus* 298 ± 26 pM, respectivamente; $P < 0, 002$). El protocolo de clamp hiperglucémico también permitió la determinación de la sensibilidad de la insulina. El valor de la venoclisis de glucosa durante el clamp se aumentó en un $11 \pm 7 \%$ en las ratas tratadas con exendina-4 en relación con las ratas de control ($P < 0,001$). En otros términos, la exendina-4 presentó un efecto gluconostático en las ratas ZDF en las investigaciones de clamp hiperglucémico, un efecto que será de ayuda terapéutica en los humanos diabéticos.

EJEMPLO 5 - FARMACOCINÉTICA DE LA EXENDINA-4 EN LAS RATAS DESPUÉS DE SU ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA, SUBCUTÁNEA E INTRAPERITONEAL

El presente Ejemplo describe el trabajo para describir la farmacocinética de la exendina-4 en ratas (~ 350 g de peso corporal cada una) después de una embolada i. v. de $2,1, 21, 210 \mu\text{g/rata}$, con administración s. c. e i. p. y una venoclisis i. v. de $2,1, 21, 210 \mu\text{g/h/rata}$ (3 h). Se analizaron muestras sucesivas de plasma ($\sim 120 \mu\text{l}$) empleando un análisis inmunoradiométrico (IRMA). Este análisis de tipos intercalado utiliza anticuerpos monoclonales basados en los ratones que reaccionan con la exendina-4 pero no reaccionan con el GLP-1 o con los metabolitos analizados de la exendina-4 o del GLP-1. El límite inferior de determinación cuantitativa fue de 15 pM (63 pg/ml). El t estimado para la exendina-4 fue de 18-41 minutos para la embolada i. v., 28 - 49 minutos para la i. v. continua, 90-216 minutos para la inyección s. c. y 125-174 minutos para la inyección i. p. La biodisponibilidad fue del 65-76 % para la inyección s. c. e i. p. La depuración determinada para la venoclisis i. v. fue de $4 - 8$ ml /min. Los valores de $C_{\text{máx}}$ y de AUC en cada vía de administración fueron proporcionales a las dosis. El volumen de distribución fue de 457 - 867 ml. La depuración y la biodisponibilidad no resultaron dependientes de la dosis. La $C_{\text{máx}}$ (o la concentración en plasma en situación de equilibrio (*steady-state*; C_{ss})) se presenta en la siguiente tabla:

$C_{\text{máx}}$ o C_{ss} (nM)				
Vía	Embolada intravenosa	Venoclisis intravenosa	Subcutánea	Intraperitoneal
Dosis				
$2,1 \mu\text{g}$	$2,9 \text{ k} \pm 0,4$	$1, 1 \pm 0, 1$	$0,56 \pm 0,12$	$0,26 \pm 0,04$
$21 \mu\text{g}$	70 ± 3	$19 \pm 1,9$	$4,1 \pm 1,5$	$3,9 \pm 1$
$210 \mu\text{g}$	645 ± 12	262 ± 60	28 ± 4	35 ± 6

EJEMPLO 6 - COMPARACIÓN DE LAS ACCIONES INSULINOTRÓPICAS DE LA EXENDINA-4 Y DEL PÉPTIDO-1 ANÁLOGO AL GLUCAGÓN (GPL-1) DURANTE UNA PRUEBA DE PROVOCACIÓN CON GLUCOSA INTRAVENOSA EN RATAS

Este experimento compara las acciones insulínótropicas de la exendina-4 sintética y el GPL-1 *in vivo* después de una prueba de provocación con glucosa intravenosa (i. v.) en ratas. Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley (~ 400 g) con halotano y se les insertó una cánula en la arteria femoral y en la vena safena. Después de un período de recuperación de 90 minutos, se administró por vía i. v. una solución salina o el péptido (30 pmol/kg/min en cada caso) (1 ml/h durante 2 horas; $n = 4 - 5$ en cada grupo). Treinta minutos después se inició la venoclisis, se inyectó la D-glucosa ($5,7$ mmol/kg, $0,8$ ml) por vía i. v. En las ratas tratadas con la solución salina, con la exendina-4 y con el GPL-1, las concentraciones de glucosa plasmática eran similares antes de la inyección ($9,3 \pm 0,3, 9,7 \pm 0,3, 10,3 \pm 0,4$ mM), se incrementaron en cantidades similares después de la inyección de glucosa ($21,7, 21,3, 23,7$ mM) y se produjeron unos valores de AUC de 60 minutos similares ($987 \pm 39, 907 \pm 30, 1096 \pm 68$ mM•min, respectivamente). Es decir, el estímulo glucémico fue similar en cada grupo de tratamiento. La concentración de insulina plasmática en las ratas tratadas con la solución salina aumentó 3, 3 veces con la prueba de provocación de glucosa (230 ± 53 hasta un pico de 765 ± 188 pM). En el caso de la venoclisis con exendina-4, el aumento en la concentración de insulina plasmática fue de 6,8 veces (363 ± 60 a 2486 ± 365 pM). Con el GPL-1 el aumento de la concentración de insulina plasmática fue de 2,9 veces (391 ± 27 a 1145 ± 169 pM), que fue similar al obtenido al de las ratas tratadas con solución salina. La AUC de 60 minutos de insulina en las ratas tratadas con la solución salina fue de 24 ± 6 nM•min, se aumentó 2,8 veces en las ratas tratadas con exendina (67 ± 8 nM•min; $P < 0,003$ *versus* la solución

salina; $P < 0,02$ versus el GLP-1) y en un 20 % en las ratas tratadas con el GLP-1 (n. e. versus la solución salina). El aumento en la liberación de insulina estimulada por la glucosa por parte de la exendina-4 también se analizó a valores de venoclisis de 3 y 300 pmol/kg/min y resultó depender de la dosis. Por lo tanto, la exendina-4 es más potente y/o eficaz que la GLP-1 al aumentar la liberación de insulina estimulada por la glucosa en ratas sanas.

5 EJEMPLO 7 - DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN ANÁLISIS INMUNORADIOMÉTRICO (IRMA) PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA EXENDINA-4 EN PLASMA Y SU APLICACIÓN EN LOS CÁLCULOS DE LA TOXICIDAD EN ANIMALES (PRECLINICAL) O EN VOLUNTARIOS SANOS (FASE I)

Se desarrolló un análisis inmunoradiométrico (IRMA) sensible y específico de tipo intercalado para la determinación cuantitativa de la concentración de exendina-4 en plasma empleando exendina-4 sintética como inmunógeno. Un anticuerpo monoclonal derivado del ratón reconoce el epítipo C-terminal de la exendina-4 (anticuerpo de captura) pero no experimenta ninguna reacción cruzada con el GLP-1. El segundo anticuerpo (anticuerpo detector marcado con ^{125}I) reconoce un epítipo N-terminal en la exendina-4 y el GLP-1, y requiere una histidina terminal para enlazarse. De ese modo, el análisis visto como una unidad no detecta el GLP-1 (7 - 36) NH_2 , el GLP-1 (7 - 36) COOH o la exendina (3 - 39). La validación analítica en el plasma de ratas, monos, perros, conejos y humanos presentó unos coeficientes de variación inter- e intra-analíticos $< 20\%$ y $< 10\%$ respectivamente, una precisión del $\pm 15\%$ con unos controles de referencia bajos, medio y altos, y con unos límites de determinación cuantitativa inferior y superior de 62,8 y 2512 pg/ml, respectivamente. Las muestras de plasma de los cálculos de toxicidad de la exendina-4 en 28 días en ratas y monos y el estudio en voluntarios sanos (fase I) se calculó empleando el IRMA. Los valores $C_{\text{máx}}$ en los estudios con animales se presentan en la siguiente tabla. Las muestras en humanos de la administración subcutánea de 0,05, 0,1, 0,2 y 0,3 $\mu\text{g/kg}$ proporcionaron unos valores de $C_{\text{máx}}$ de 90, 224, 370 y 587 pg/ml.

$C_{\text{máx}}$ (pg/ml)			
Dosis ($\mu\text{g/kg}$)	10	100	1000
Rata	7000	127000	1180000
Mono	20000	170000	1890000

EJEMPLO 8 - COMPARACIÓN ENTRE EL RECEPTOR DE ACTIVACIÓN/ENLACE DEL GLP-1 Y LOS EFECTOS EN LA DISMINUCIÓN DEL NIVEL DE GLUCOSA DEL GLP-1 Y LA EXENDINA-4

La exendina-4 se sintetizó mediante las técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida y se comparó con el GLP-1 sintético desde el punto de vista de, *in vitro*, su capacidad de enlace a, y la activación de los receptores del GLP-1 y, *in vivo*, desde el punto de vista de la disminución de la glucosa plasmática en ratones diabéticos *db/db*. En una preparación de membrana plasmática de una estirpe celular de insulinoma de rata (RINm5f) que expresa el receptor del GLP-1, se analizaron los péptidos para determinar su capacidad de enlazarse y desplazar el GLP-1 radiomarcado y su capacidad para estimular la producción de AMPc. Se encontró que el orden relativo de potencia de enlace era GLP-1 > exendina-4. El orden relativo de la activación de la ciclase era GLP-1 = exendina-4. Las afinidades, tal como se muestran en la siguiente tabla, difieren alrededor de 4 ó 5 veces. En contraste, la potencia en la disminución del nivel de glucosa *in vivo* difería alrededor de 3430 veces. La exendina-4 fue 3430 veces más potente que el GLP-1. La potencia *in vivo* de la exendina-4 no se corresponde con la del receptor del GLP-1, y es probablemente la culminación de un cúmulo de propiedades.

	Enlace IC_{50} (nM)	Ciclase EC_{50} (nM)	Disminución del nivel de glucosa ED_{50} (μg)
GLP-1	0,15	0,28	20,6
Exendina-4	0,66	0,30	0,006

EJEMPLO 9- COMPARACIÓN DE LOS ÍNDICES DE GLUCEMIA Y LA SENSIBILIDAD DE LA INSULINA EN RATAS DIABETIC FATTY ZUCKER DE CONTROL Y EN RATAS TRATADAS CON EXENDINA-4

El presente ejemplo analiza si los efectos beneficiosos de la exendina-4 en las ratas ZDF fueron consecuencia de los cambios en la ingesta alimenticia. Compara los efectos obtenidos con la exendina-4 con los efectos observados en animales correspondientes tratados con solución salina que consumieron la misma cantidad de alimento que consumieron las ratas ZDF inyectadas por vía subcutánea con 10 μg de exendina-4. Los niveles de glucosa

plasmática y de HbA_{1c} se determinaron semanalmente durante 6 semanas. Un día después del último tratamiento, se anestesiaron los animales con halotano y se sometieron a un clamp euglicémico hiperinsulinémico (50 mU/kg/min). Los cambios en la HbA_{1c} durante 6 semanas difirieron entre los grupos de tratamiento (ANOVA, $P < 0,001$), aumentando en las ratas alimentadas *ad lib* ($n = 5$) y en las de control alimentadas con la misma cantidad de comida ($n = 5$), pero disminuyó en las ratas tratadas con exendina-4 ($n = 5$). De una manera similar, los cambios en el nivel de glucosa plasmática difirieron entre los grupos de tratamiento (ANOVA, $P < 0,002$), aumentando en las ratas alimentadas *ad lib* y en las de control alimentadas con la misma cantidad de comida, y disminuyendo en las ratas tratadas con exendina-4. En la última hora de un protocolo de clamp de 3 horas, el valor de la venoclisis de glucosa en las ratas tratadas con exendina-4 tendió a ser superior al de las del grupo de control alimentadas con la misma cantidad de comida (+105 %) y las alimentadas *ad lib* (+20 %), respectivamente ($10,14 \pm 1,43$ $n = 5,8$, $46 \pm 0,87$ $n = 4,4$, $93 \pm 2,02$ mg/kg/min $n = 3$; n. e. $P = 0,09$, ANOVA). Otro índice de sensibilidad de la insulina, la concentración de lactato en plasma, difería significativamente entre los grupos de tratamiento (ANOVA, $P < 0,02$) y era inferior en las ratas tratadas con exendina-4. Por lo tanto, el tratamiento con exendina-4 se asocia con la mejora de los índices glucémicos, y la sensibilidad de insulina que se corresponde parcialmente, pero no totalmente, en los controles alimentados con la misma cantidad de comida, indicando que las mejoras del control metabólico con la exendina-4 en las ratas ZDF se debe al menos en parte a mecanismos que van más allá de la restricción calórica.

EJEMPLO 10 - ESTUDIOS CLÍNICOS Y LA ESTIMULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE INSULINA ENDÓGENA CON EXENDINA-4 SINTÉTICA SUBCUTÁNEA EN VOLUNTARIOS SANOS SOMETIDOS A AYUNO DURANTE LA NOCHE

En un estudio clínico con doble anonimato controlado con placebo con dosis únicas ascendentes para explorar la toxicidad y la tolerabilidad y farmacocinética de la exendina-4 sintética, se calculó la cantidad de exendina-4 para su inyección subcutánea en voluntarios varones sanos al mismo tiempo que se valoraban los efectos en la glucosa plasmática y las concentraciones de insulina. Se estudiaron cinco dosis subcutáneas únicas de exendina-4 (0,01, 0,05, 0,1, 0,2 o 0,3 µg/kg) en 40 voluntarios varones sanos en ayunas. Las concentraciones máximas de exendina-4 en el plasma se alcanzaron entre 1 y 2 horas después de la administración de la dosis con pocas diferencias entre las dosis examinadas. El examen de los datos indicó un aumento dependiente de la dosis para $C_{\text{máx}}$. No se informó de efectos adversos graves en el presente estudio y la exendina-4 fue bien tolerada en los voluntarios varones sanos que participaron en este estudio en las dosis que llegaron hasta 0,1 µg/kg. También se observó un descenso en la concentración de glucosa plasmática a estas dosis. A dosis de 0,2 µg/kg o superiores, los efectos adversos observados más frecuentes fueron cefaleas, náuseas, vómitos, mareos e hipotensión ortostática. Se produjo un descenso transitorio en la concentración de glucosa plasmática después de la administración de dosis de 0,05 µg/kg y superiores.

Cuarenta pacientes sanos, delgados (media de IMC ($\pm$ DT) $22,7 \pm 1,2$), de edades comprendidas entre los 18 y los 40 años fueron asignados aleatoriamente a 5 grupos. En cada grupo de 8 pacientes, 6 fueron asignados al tratamiento con exendina-4 y 2 al tratamiento con placebo (PBO). Se administró la exendina-4 (0,01, 0,05, 0,1, 0,2 o 0,3 µg/kg) o el placebo después de una noche en ayunas y se realizó el seguimiento de las concentraciones plasmáticas de exendina-4, glucosa e insulina junto con la toxicidad y tolerabilidad. No se presentaron indicios de toxicidad. Las dosis $\leq 0,1$ µg/kg se toleraron igual de bien que el PBO mientras que las de 0,2 µg/kg y 0,3 µg/kg provocaron náuseas y vómitos en un nivel dependiente de la dosis. Las concentraciones máximas de exendina-4 aumentaron en función de la dosis y a partir de 0,1 µg/kg, la inmunorreactividad de la exendina-4 persistió durante 360 minutos. Los niveles de glucosa plasmática disminuyeron después de todas las dosis, excepto con 0,01 µg/kg, alcanzaron el nadir en 30 minutos y volvieron a los valores iniciales antes de 180 minutos. A los pacientes que recibieron 0,3 µg/kg se les suministró una bebida calórica 30 minutos después de la administración de la dosis, excluyendo la comparación de sus datos. El cambio medio en la glucosa plasmática (0 - 180 minutos): $0,03 \pm 0,07$, $-0,07 \pm 0,08$, $-0,38 \pm 0,14$, $-0,85 \pm 0,13$ y $-0,83 \pm 0,3$ mmol/l para el PBO, 0,01, 0,05, 0,1, y 0,2 µg/kg respectivamente; $P \leq 0,02$ versus PBO. El nivel más bajo de glucosa plasmática registrado fue de 3,4 mmol/l. Los cambios significativos correspondientes en la insulina plasmática (0-120 min) fueron $0,43 \pm 0,59$, $2,37 \pm 0,58$, $2,28 \pm 0,66$, $4,91 \pm 1,23$ y $14,00 \pm 3,34$ µU/ml; $P \leq 0,01$ versus PBO para los grupos de 0,1 y 0,2 µg/kg. Por lo tanto, en los voluntarios sanos que ayunaron por la noche, la inyección subcutánea de exendina-4 (1) no presentó problemas de toxicidad, (2) fue bien tolerada a dosis $\leq 0,1$ µg/kg, (3) provocó la inmunorreactividad de la exendina-4 en plasma durante hasta 6 horas, (4) aumentó el nivel de insulina plasmática y disminuyó el nivel de glucosa plasmática de manera dependiente de la dosis sin producir hipoglucemia.

EJEMPLO 11 - EFICACIA DE LA ADMINISTRACIÓN ALTERNATIVA DE EXENDINA-4 EN ROEDORES

El presente ejemplo analizó la administración por medios alternativos a la inyección, y examinó su capacidad para atravesar las superficies de las mucosas en cantidades suficientes como para producir un efecto biológico. Los cambios en la concentración de la glucosa plasmática y de la exendina-4 sintética intacta (determinada mediante un análisis inmunoradiométrico bilateral) se observaron en ratones *db/db* a los que se administró una solución salina que contenía diferentes dosis de exendina-4 por vía endotraqueal, por vía pulmonar (aerosolizada), mediante sonda nasogástrica (oral), y debajo de la lengua (sublingual). Se analizaron en ratas las mismas vías de administración, así como la intraduodenal y la intranasal, y se calculó la biodisponibilidad, por ejemplo, para las vías sublingual y endotraqueal. La exendina-4 administrada mediante cada una de las anteriores vías en ratones produjo un descenso significativo en la actividad de reducir el nivel de glucosa entre 1 y 4 horas después de la administración

(ratones *db/db* endotraqueal $P < 0,02$; ratones *ob/ob* endotraqueal $P < 0,0002$; ratones *db/db* aerosol $P < 0,0001$; sonda nasogástrica $P < 0,002$; sublingual $P < 0,02$). Los aumentos en la concentración de exendina-4 en plasma llegaron hasta 777 ± 365 pg/ml (ratones *db/db* endotraqueal); 170 ± 67 pg/ml (ratones *db/db* aerosol); 4520 ± 1846 pg/ml (ratones *db/db* sublingual). De manera similar, se observaron concentraciones de exendina-4 hasta 68682 ± 38661 pg/ml (endotraqueal); 1900 pg/mL (pulmonar); 6757 pg/ml (intranasal); 3862 ± 2844 pg/ml (sublingual); pero no se observó actividad aparente de absorción o biológica cuando se administraron por vía intraduodenal. La biodisponibilidad de la exendina-4 en solución salina fue de un $-7,3\%$ a dosis inferiores cuando se administró por la vía endotraqueal, donde se observó un $61-74\%$ d $C_{m\acute{a}x}$ en 5 minutos. A partir de entonces las cinéticas fueron similares a las observadas después de la administración subcutánea. La biodisponibilidad de exendina-4 en solución salina administrada debajo de la lengua fue del $3,1-9,6\%$ a dosis inferiores. Estos estudios respaldan la administración de exendina-3 y de análogos peptídicos de la misma en cantidades biológicamente efectivas por vías adecuadas no inyectables.

EJEMPLO 12 - ESTUDIO DE ANONIMATO SENCILLO CONTROLADO CON PLACEBO SOBRE LOS EFECTOS METABÓLICOS DE UNA VARIEDAD DE DOSIS DE EXENDINA-4 SINTÉTICA ADMINISTRADA MEDIANTE INYECCIÓN SUBCUTÁNEA A PACIENTES CON DIABETES MELLITUS DE TIPO II

El presente estudio describe los resultados de un estudio de dos partes, de anonimato sencillo, controlado por placebo, para examinar los efectos metabólicos de una variedad de dosis de exendina-4 sintética administrada por vía subcutánea a pacientes con *diabetes mellitus* de tipo II. Los pacientes implicados en el estudio eran personas diagnosticadas con diabetes de tipo II que estaban controladas mediante dieta y/o con agentes orales hipoglucémicos (OHAs) y con una concentración de $HbA_{1c} \geq 7,0\%$ y $\leq 12,0\%$ en la visita de examen.

El estudio se inició con una visita de examen, después de la cual se dio instrucciones a los pacientes que tomaban OHAs para que cesaran dicha medicación y volvieran al centro clínico aproximadamente 14 días después de cuando se hubieran disipado los efectos de la medicación. Los pacientes que participaron en la Parte 1 llegaron al centro clínico la tarde anterior a la primera dosis y iniciaron los tres o cuatro días programados para la dosificación. La dosificación se programó de manera que pasaran 24 horas entre cada administración.

Después de dar el consentimiento y ser examinados, los pacientes fueron asignados al azar para recibir la exendina-4 sintética o el placebo. En la primera parte del estudio, seis pacientes se ingresaron en una unidad de investigación clínica durante tres o cuatro días y fueron asignados a una de las 4 secuencias de tratamiento, en las que iban a recibir cada una de las siguientes dosis: placebo o exendina-4 sintética a 0, 1 o 0,01, posiblemente 0,001 $\mu\text{g/kg}$. Se administraron las dosis por vía subcutánea después de permanecer en ayunas por la noche. Se les proporcionó alimento líquido estandarizado 15 minutos después de la inyección de la medicación a estudiar. La siguiente tabla ilustra la programación de la dosificación para la Parte 1:

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4*
Paciente 1	Placebo	0,1 $\mu\text{g/kg}$	0,01 $\mu\text{g/kg}$	0,001 $\mu\text{g/kg}$
Paciente 2	Placebo	0,1 $\mu\text{g/kg}$	0,01 $\mu\text{g/kg}$	0,001 $\mu\text{g/kg}$
Paciente 3	0,1 $\mu\text{g/kg}$	Placebo	0,01 $\mu\text{g/kg}$	0,001 $\mu\text{g/kg}$
Paciente 4	0,1 $\mu\text{g/kg}$	Placebo	0,01 $\mu\text{g/kg}$	0,001 $\mu\text{g/kg}$
Paciente 5	0,1 $\mu\text{g/kg}$	0,01 $\mu\text{g/kg}$	Placebo	0,001 $\mu\text{g/kg}$
Paciente 6	0,1 $\mu\text{g/kg}$	0,01 $\mu\text{g/kg}$	Placebo	0,001 $\mu\text{g/kg}$

* Solamente se realizará si se observa un efecto en el nivel de glucosa el Día 3.

En la segunda parte del estudio, aproximadamente tres días después de terminar la Parte 1, también se ingresaron ocho pacientes en una unidad de investigación clínica durante 4 días. Los pacientes eran distintas personas de las que participaron en la Parte 1. Los procedimientos y la programación de los sucesos durante la Parte 2 concordaban con los de la Parte 1. Las dosis se determinaron después de que se analizó el efecto en el nivel de glucosa en la Parte 1.

Debido a que no se encontró un efecto significativo a 0,01 $\mu\text{g/kg}$ durante la Parte 1, en la Parte 2 se administró a los pacientes unas dosis de acuerdo con la siguiente programación:

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4*
Grupo A	Placebo	0,02 µg/kg	0,05 µg/kg	0,1 µg/kg
Grupo B	0,02 µg/kg	0,1 µg/kg	Placebo	0,05 µg/kg
Grupo C	0,05 µg/kg	Placebo	0,1 µg/kg	0,02 µg/kg
Grupo D	0,1 µg/kg	0,05 µg/kg	0,02 µg/kg	Placebo

Los pacientes que participaron en la Parte 2 iniciaron su dosificación después de la revisión de los datos de la Parte 1 de la misma manera. Todos los pacientes volvieron al centro clínico de 4 a 6 días después de que se les diera la alta de la unidad de ingreso para un nuevo estudio de toxicidad.

- 5 La exendina-4 sintética empleada en el estudio fue una solución incolora transparente para inyección subcutánea, con una formulación en solución amortiguadora de acetato de sodio (pH 4, 5) que contenía un 4, 3% de manitol y un modificador de la iso-osmolalidad. La concentración de la inyección de exendina-4 sintética fue de 0, 1 mg/ml. Se suministró un ml de solución en viales de 3 ml con un tapón de goma. La solución placebo consistía en la misma formulación sin el medicamento, la exendina-4 sintética.
- 10 Los resultados del estudio se presentan en las Figuras 16 y 17. Indican la capacidad de las distintas dosis de exendina-4 (0,02 µg/kg, 0,05 µg/kg y 0,1 µg/kg) para disminuir el nivel de glucosa en sangre en personas con diabetes de tipo II.

EJEMPLO 13

- 15 El presente ejemplo describe un experimento para determinar la respuesta en función de la dosis para los efectos sobre la sensibilidad de la insulina de la exendina-4 y de los agonistas de la misma en las ratas *Diabetic Fatty Zucker*. La exendina-4 de estos estudios se obtuvo de Bachem (Torrance, CA; Cat H8730, lote 506189) , American Peptides (Sunnyvale, CA; Cat 301577, lote K10051TI) y a partir de la síntesis interna en fase sólida (lote AR1374-11; contenido peptídico 93, 3%) . Treinta y nueve machos de ratas *Diabetic Fatty Zucker* (ZDF) GmiTM- (fa/fa) (edad 116 ± 20 días; peso 441 ± 39 g) se asignaron a 5 grupos de tratamiento: inyecciones de solución salina solamente (n = 9)
- 20 , inyecciones de exendina-4 0, 1, 1, 10 ó 100 µg (n = 9, 10, 6, 5, respectivamente) . De ellas, 35 ratas se utilizaron en estudios de clamp euglicémico hiperinsulinémico (n = 9, 7, 9, 5, 5, respectivamente) . Se realizó la extracción de muestras de sangre desde la cola, anestesiada por vía tópica (marca Hurricaine de un 20% de solución de benzocaína tópica, Beutlich, Waukegan, IL) de ratas sometidas a ayuno durante la noche y mantenidas conscientes antes del tratamiento y a intervalos semanales durante 5 semanas durante el tratamiento para el análisis de la hemoglobina A_{1c} (látex de inhibición de la inmunoaglutinación DCA2000 Bayer Diagnostics, Tarr y town, NY) . El
- 25 peso corporal se determinó diariamente.

- Después de 6 semanas de tratamiento, ~ 16 horas después de la última dosis de exendina-4 (o de solución salina) , y después de ayunar durante la noche, se realizaron los clamps euglicémicos hiperinsulinémicos (DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R: *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance* [Técnica de clamp con glucosa: un método para realizar la determinación cuantitativa de la secreción y resistencia de la insulina], *Amer J Physiol* 237:E214-23, 1979) con ratas anestesiadas con halotano. Las ratas fueron termorreguladas, se les realizó una traqueotomía y se les insertó un catéter en vena safena para la venoclisis de un 20% de D-glucosa y de insulina, y vía la arteria femoral para la recogida de muestras de sangre y seguimiento de la tensión arterial (transductor P23XL, Spectramed, Oxnard, CA; amplificador universal, Gould, Valley View, OH; conversión A/C, DataTranslation, Wilmington, DE). Se realizó la venoclisis de la insulina (Humulin-R, Eli Lilly, Indianapolis, IN) a 50 mU/kg/min, empezando a t = -30 minutos y se continuó hasta t = + 180 minutos. Se realizó la venoclisis de la glucosa a una velocidad variable para mantener la euglucemia, se determinó mediante el muestreo y análisis de glucosa a intervalos de 5 minutos (método de la glucosa oxidasa inmovilizada; YSI 2300-Stat Analyzer, Yellow Springs, OH). El promedio de glucosa plasmática durante los clamps fue de 103,9 mg/dl (el coeficiente de variación promedio fue del 5, 8 %). Los valores de la velocidad de venoclisis de la glucosa se tomaron desde t = 60 - 180 minutos cuando las respuestas se acercaron a un equilibrio dinámico. También se recogieron los valores del nivel de lactato en plasma, obtenidos con un sensor de lactato oxidasa inmovilizada incorporado en el analizador de glucosa.
- 35
- 40

- Las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal a las ~ 8 de la mañana y a las 4 de la tarde, desde el lunes hasta el viernes, y a las ~ 10 de la mañana el sábado y el domingo.
- 45

Los análisis estadísticos para datos aparejados se realizaron empleando programas de la prueba t de Student (Instat v3.0, GraphPad Software, San Diego, CA) utilizando un nivel de significación de P < 0,05. Los análisis de dosis y

respuesta se realizaron con una regresión logística de 4 parámetros y los efectos generales se calcularon realizando un análisis de la varianza (ANOVA) unidireccional (Prism v3.0, GraphPad Software, San Diego, CA).

Los resultados mostraron que en las ratas *Diabetic Fatty Zucker* tratadas con dosis distintas de exendina-4 durante 6 semanas, se produjo una reducción de la ingesta alimenticia en función de la dosis (DE_{50} $0,14 \mu\text{g} \pm 0,15 \log$; ver Figura 13a) y en el peso corporal (DE_{50} $0,42 \mu\text{g} \pm 0,15 \log$; ver Figura 13b) de hasta $27 \pm 2 \text{ g}$, representando un descenso en el peso corporal del $5,6 \pm 0,5 \%$ en relación con los controles inyectados con la solución salina.

En este grupo de ratas, la evolución de la diabetes se mostró como progresiva, ya que la hemoglobina A_{1c} inicialmente aumentó en todos los grupos. Sin embargo, la inyección de exendina-4 pareció detener e invertir el aumento en la hemoglobina A_{1c} en función de la dosis (ver figura 13c). La dosis y respuesta de la exendina-4 para el efecto sobre la hemoglobina A_{1c} determinado durante las 2 últimas semanas de tratamiento, en general, resultó significativa (ANOVA $P = 0,05$) y específicamente a dosis de $1 \mu\text{g}$ y $100 \mu\text{g}$ ($P < 0,005$, $P < 0,02$ respectivamente). Un modelo similar se observó en relación con los triglicéridos en plasma en ayunas en las dos últimas semanas de tratamiento, en las que las concentraciones se vieron reducidas significativamente con todas las dosis entre un 51% y un 65% (ANOVA $P < 0,002$).

Treinta y cinco de las 39 ratas entraron en un estudio progresivo con un clamp euglicémico hiperinsulinémico ~ 16 horas después del último tratamiento. Las concentraciones iniciales de glucosa plasmática en ayunas, superiores en las ratas tratadas con solución salina ($489 \pm 28 \text{ mg/dl}$) que en las ratas tratadas con exendina, disminuyeron con la venoclisis de insulina y posteriormente se realizó el clamp a concentraciones de glucosa plasmática similares ($105,6 \text{ mg/dl}$ a $60 - 180$ minutos; coeficiente de variación medio $4,6 \%$; ver Figura 14a). La velocidad de venoclisis de glucosa requerida para mantener la euglucemia se vio aumentada en función de la dosis debido al tratamiento previo con exendina-4 (DE_{50} $1,0 \mu\text{g} \pm 0,41 \log$; ver Figura 14b). El tratamiento con exendina-4 aumentó la velocidad de venoclisis de la glucosa hasta un 48% en relación con los controles tratados con la solución salina.

La concentración de lactato en plasma antes y durante el procedimiento del clamp se vio reducida en función de la dosis debido al tratamiento previo con exendina-4 (DE_{50} $4 \mu\text{g} \pm 0,25 \log$; ver Figura 14c). Este efecto, que representa hasta un 42% de reducción en la concentración media de lactato en plasma entre 60 y 180 minutos de clamp, apareció principalmente debido a una reducción de la concentración de lactato de preclamp (inicial); los incrementos en el nivel de lactato en plasma durante el período de hiperinsulinemia fueron similares en todos los grupos de tratamiento. No se produjeron diferencias relacionadas con el tratamiento en la tensión arterial determinada antes o durante los procedimientos de clamp.

El aumento de aproximadamente un 50% en la sensibilidad de la insulina observado después de la administración prolongada de exendina-4 resultó tan importante como sorprendente al haber observado que la exendina-4 no tiene efecto inmediato en los tejidos sensibles a la insulina *in vitro* (es decir, sin efecto en la incorporación basal o estimulada por la insulina de la glucosa radiomarcada en el glucógeno en el músculo sóleo aislado, o en los lípidos de adipocitos aislados; Pittner *et al*, sin publicar). A pesar de que la posibilidad de que el aumento en la sensibilidad de la insulina sea el resultado en parte de algún control glucémico mejorado y la toxicidad de la glucosa reducida no se ha de pasar por alto, se ha publicado que el aumento en la sensibilidad de la insulina en distintas terapias antidiabéticas, entre ellas las no clasificadas como sensibilizadoras de la insulina, es bastante variable y se ha publicado que el tratamiento inmediato con GLP-1 parece que no altera inmediatamente la sensibilidad de la insulina en los seres humanos (Orskov L, Holst JJ, Moller J, Orskov C, Moller N, Alberti KG, Schmitz O: *GLP-1 does not acutely affect insulin sensitivity in healthy man* (El GLP-1 no afecta de forma inmediata la sensibilidad de la insulina en el hombre sano). *Diabetologia* 39:1227-32, 1996; Ahren B, Larsson HI Holst JJ: *Effects of glucagon-like peptide-1 on islet function and insulin sensitivity in noninsulindependent diabetes mellitus* (Efectos del péptido análogo al glucagón-1 en la función de los islotes y la sensibilidad de la insulina en la diabetes sacarina no insulino dependiente). *J Clin Endocrinol Metab* 82:473-8, 1997; UK Prospective Diabetes Study Group: *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes* (Control intensivo del nivel de glucosa en sangre con sulfonilureas o insulina en comparación con el tratamiento convencional y riesgo de complicaciones en pacientes con diabetes de tipo II) (UKPDS 33), *Lancet* 35 2:837-53, 1998). Por lo tanto la administración prolongada de la exendina-4 parece encontrarse asociada a los incrementos en la sensibilidad de la insulina que son de igual magnitud, si no superiores, a aquellos observados en otros tipos de terapia, entre ellos los fármacos sensibilizadores de la insulina tales como las tiazolidinedionas y la metformina.

EJEMPLOS DEL A LA E

Reactivos empleados

El GLP-1[7-36] NH_2 (GLP-1) se adquirió en Bachem (Torrance, CA). Todos los otros péptidos se prepararon empleando métodos de síntesis tales como los descritos en el presente documento. Todos los productos químicos eran de la máxima calidad comercial. El inmunoanálisis SPA de AMPc se adquirió en Amersham. Los radioligandos se adquirieron en New England Nuclear (Boston, MA). La estirpe celular RINm5f (American Type Tissue Collection, Rockville, MD) se cultivó en un medio DME/F12 con un 10% de suero bovino fetal y 2 mM de L-glutamina. Las células se cultivaron a 37°C y a un 5% de aire con un $\text{CO}_2/95 \%$ humidificado y el medio se reemplazó cada 2 o 3

días. Se hicieron crecer las células hasta la confluencia, entonces se cultivaron y se homogeneizaron en un homogeneizador Plytron. Los homogeneizados de células se guardaron congelados a -70 °C hasta ser utilizados.

EJEMPLO A - ESTUDIOS SOBRE LA FIJACIÓN DEL GLP-1 A SU RECEPTOR

Se valoró la fijación al receptor determinando el desplazamiento del [¹²⁵I]GLP-1 o de la [¹²⁵I]exendina (9-39) de las membranas de las células RINm5f. La solución amortiguadora de valoración contenía 5 µg/ml de bestatin, 1 µg/ml de fosforamidón, 1 mg/ml de albúmina de suero bovino (fracción V), 1 mg/ml de bacitracina, y 1 mg de MgCl₂ en 20 mM de HEPES, a pH 7,4. Para determinar el nivel de fijación, se resuspendieron 30 µg de proteínas de membrana (valoración de proteínas Bradford) en 200 µl de solución amortiguadora de valoración y se incubaron con 60 pM de [¹²⁵I]GLP-1 o de la [¹²⁵I]exendina (9 - 39) y péptidos sin marcar durante 120 minutos a 23 °C en 96 placas con pocillos (Nagle Nunc, Rochester, NY). Se terminaron las incubaciones mediante la filtración rápida con solución salina amortiguada con fosfato, a pH 7,4, a través de filtros de fibra de vidrio GF/B tratados con polietilenimina (Wallac Inc., Gaithersburg, MD) empleando una placa de cultivo Tomtec Mach II (Wallac Inc., Gaithersburg, MD). Se secaron los filtros, se combinaron con un escintilante, y se determinó la radiactividad en un contador de centelleo líquido Betaplate (Wallac Inc.).

Las muestras de péptido se analizaron como puntos duplicados en 6 diluciones a una concentración entre 10⁻⁶M y 10⁻¹²M para originar las curvas de respuesta. La actividad biológica de la muestra se expresa como un valor IC₅₀, calculado a partir de los datos sin procesar empleando un programa iterativo de ajuste a curvas que emplea una ecuación logística de 4 parámetros (Prizm, GraphPAD Software).

EJEMPLO B - ESTUDIO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA CICLASA

La solución amortiguadora de valoración contenía 10 µM de GTP, 0,75 mM de ATP, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 mM de fosfocreatina, 12,5 U/ml creatinasa, 0,4 mg/ml aprotinina, 1 µM de IBMX en 50 mM de HEPES, a pH 7,4. Las membranas y los péptidos se combinaron en 100 ml de solución amortiguadora de valoración en placas de 96 pocillos con filtro en el fondo (Millipore Corp., Bedford, MA). Después de incubación durante 20 minutos a 37 °C, se terminó el ensayo transfiriendo el sobrenadante de la filtración en una nueva placa de 96 pocillos empleando un colector de vacío Millipore. El contenido en AMPc del sobrenadante se determinó mediante inmunoanálisis SPA. Las muestras peptídicas se analizaron como puntos triplicados en 7 diluciones a una concentración entre 10⁻⁶M y 10⁻¹²M para originar las curvas de respuesta. La actividad biológica de la muestra se expresa como un valor EC₅₀, calculado tal como se ha descrito anteriormente.

EJEMPLO C - DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE EN RATONES DB/DB

En este estudio se emplearon ratones C57BLKS/J-m-db de al menos 3 meses de edad. Los ratones se adquirieron en The Jackson Laboratory y se dejó que se aclimataran durante una semana antes de utilizarlos. Se alojaron los ratones en grupos de diez a 22 °C ± 1 °C siguiendo un ciclo de luz - oscuridad de 12:12, encendiendo las luces a las 6 de la mañana. Se privó a todos los animales de comida durante las dos horas anteriores a la extracción de las muestras de sangre iniciales. Se extrajo aproximadamente 70 µl de sangre de cada ratón mediante punción ocular después de haberlos anestesiado ligeramente con metofano. Después de recoger las muestras iniciales de sangre, para determinar las concentraciones de glucosa plasmática, todos los animales recibieron inyecciones subcutáneas de excipiente líquido (10,9 % de NaCl), exendina-4 o el compuesto de prueba (1 µg) en el excipiente. Se realizó una nueva extracción de muestras de sangre, empleando el mismo procedimiento, una hora exacta después de las inyecciones, y se determinaron las concentraciones de glucosa plasmática. Para cada animal se calculó el % de cambio en el valor plasmático, a partir del valor inicial.

EJEMPLO D - DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LA DOSIS Y LA RESPUESTA EN LOS NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE EN RATONES DB/DB

En este estudio se emplearon ratones C57BLKS/J-m-db/db de al menos 3 meses de edad. Los ratones se adquirieron en The Jackson Laborator y se dejó que se aclimataran durante una semana antes de utilizarlos. Se alojaron los ratones en grupos de diez a 22 °C ± 1 °C siguiendo un ciclo de luz - oscuridad de 12:12, encendiendo las luces a las 6 de la mañana. Se privó a todos los animales de comida durante las dos horas anteriores a la extracción de las muestras de sangre iniciales. Se extrajo aproximadamente 70 µl de sangre de cada ratón mediante punción ocular después de haberlos anestesiado ligeramente con metofano. Después de recoger las muestras iniciales de sangre, para determinar las concentraciones de glucosa plasmática, todos los animales recibieron inyecciones subcutáneas de excipiente líquido, exendina-4 o el compuesto de prueba en las concentraciones indicadas. Se realizó una nueva extracción de muestras de sangre, empleando el mismo procedimiento, una hora exacta después de las inyecciones, y se determinaron las concentraciones de glucosa plasmática. Para cada animal se calculó el % de cambio en el valor plasmático, a partir del valor inicial, y se analizó su relación de dependencia con la dosis empleando el software de Graphpad PrizmTM.

EJEMPLO E - VACIADO GÁSTRICO

Se realizó el siguiente estudio y así puede llevarse a cabo para investigar los efectos de la exendina-4 y/o de los compuestos agonistas de la exendina en el vaciado gástrico en ratas. En este experimento se siguió una modificación del método de Scarpignato, *et al.*, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 246:286-94, 1980. Se utilizaron

machos de ratas Harlan Sprague Dawley (HSD). Se alojaron todos los animales a 22, 7°C ± 0, 8°C siguiendo un ciclo de luz - oscuridad de 12:12 (los experimentos se llevaron a cabo durante el período diurno del ciclo) y se les alimentó y dio de beber *ad libitum* (Diet LM-485, Teklad, Madison, WI) . Se sintetizó la exendina-4 de acuerdo con los métodos estándar de síntesis de péptidos. La preparación de la exendina-4 se describe en el ejemplo 14. La determinación del vaciado gástrico mediante el método descrito a continuación se realizó después de un ayuno de ~ 20 horas para garantizar que el estómago no contenía productos químicos que interfirieran con las cuantificaciones de la absorbencia espectroscópica.

Se administró a las ratas conscientes, mediante sonda nasogástrica, 1, 5 ml de un gel acalórico que contenía un 1,5 % metilcelulosa (M-0262, Sigma Chemical Co, St Louis, MO) y un 0,05 % indicador rojo fenol. Veinte minutos después de la administración, se anestesiaron las ratas empleando halotano al 5 %, se puso al descubierto el estómago y se realizó el clamp en los esfínteres pilórico y del esófago inferior empleando pinzas hemostáticas, se quitó y se abrió en una solución alcalina preparada hasta un volumen determinado. El contenido del estómago se obtuvo a partir de la intensidad del rojo fenol en la solución alcalina, determinándose mediante la absorbencia a una longitud de onda de 560 nm. En experimentos separados en 7 ratas, se extirparon tanto el estómago como el intestino delgado y se abrieron en una solución alcalina. La cantidad de rojo fenol que se pudo recoger del tracto gastrointestinal superior en 20 minutos de aplicación de la sonda fue del 89 ± 4 %; la tintura que parece fijarse irreversiblemente a la superficie de la luz intestinal podría representar el cálculo del balance. Para representar el máximo de recuperación de tinte menor del 100 %, el porcentaje del contenido restante del estómago después de 20 minutos se expresó como fracción del contenido gástrico extraído de las ratas de control sacrificadas inmediatamente después de la administración por vía nasogástrica en el mismo experimento. El porcentaje del contenido gástrico restante = (absorbencia a los 20 minutos)/(absorbencia a 0 mm) x 100.

Diversas modificaciones de la invención además de las presentadas y descritas en el presente documento se harán patentes para los expertos en la especialidad a partir de la descripción precedente y forman parte del ámbito de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que es una forma farmacéutica líquida parenteral estable adecuada para la administración en múltiples usos que comprende del 0,005 % al 0,4 % (p/v) de una exendina en un sistema acuoso, del 0,02 % al 0,5 % (p/v) de un acetato, fosfato, citrato o glutamato o un amortiguador similar, solo o en combinación, del 1,0 % al 10 % (p/v) de un modificador de la iso-osmolalidad de hidrato de carbono o alcohol polihídrico que conduce a una solución isotónica o iso-osmolar en una fase acuosa continua y del 0,005 al 1,0 % (p/v) de m-cresol, presentando dicha formulación un pH entre 4,0 y 6,0.
2. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la exendina es exendina-4.
3. Una formulación de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que la exendina está presente en una concentración de entre un 0,005 % y un 0,05 % (p/v).
4. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la solución reguladora del pH es una solución de acetato o de glutamato.
5. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la solución reguladora del pH es una solución de acetato.
6. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el pH está entre 4,0 y 5,0.
7. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el modificador de la iso-osmolalidad es el manitol o el sorbitol.
8. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el modificador de la iso-osmolalidad es el manitol.
9. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la forma farmacéutica líquida estable es adecuada para:
 - (a) la administración vía inyección para alcanzar una dosis de 0,1 a 0,5 µg por kilogramo de una exendina o
 - (b) la administración vía inyección para alcanzar una dosis de 1 µg a 1 mg de una exendina por día.
10. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la formulación es adecuada para la administración vía inyección para alcanzar una dosis de 0,005 µg/kg por dosis a 0,2 µg/kg por dosis de una exendina.
11. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para utilizar en el aumento de la sensibilidad de un paciente hacia la insulina exógena o endógena.

EXENDINA-3

His	Ser	Asp	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Met	Glu	Glu
1				5					10					15	
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		
Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	2NH								
		35													

Fig. 1

EXENDINA-4

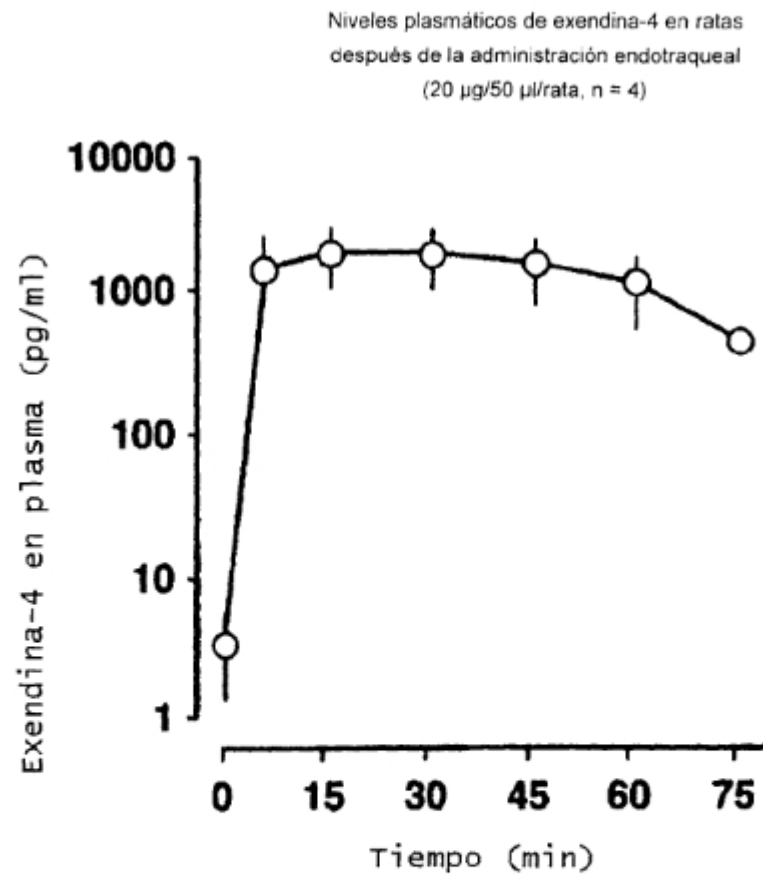
His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Met	Glu	Glu
				5					10					15	
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		
Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser-NH ₂									
		35													

Fig. 2

GLP-1 (GLP-1[7-36] NH₂)

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg-NH ₂		
			20					25					30		

Fig. 3



Se mantuvo los machos de rata (350 – 400 g) en ayunas durante la noche y se procedió a la canulación de la tráquea y la arteria femoral con los animales anestesiados. Se extrajo la sangre de la arteria antes y después (5, 15, 30, 45, 60 y 75 minutos) de la administración endotraqueal de 20 µg de exendina-4 disuelta en 50 µl de solución salina en cada rata. Los niveles plasmáticos de exendina-4 se determinaron mediante un análisis inmunoradiométrico.

Fig. 4

Concentración plasmática de la exendina-4 después de la instilación endotraqueal (1 µg/20

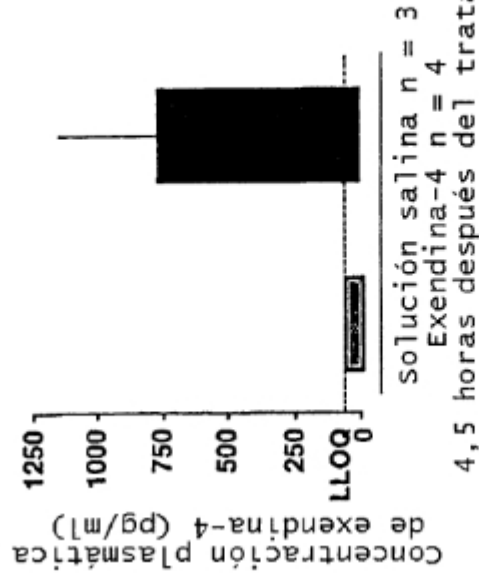


Fig. 5A

glucosa plasmática de ratones db/db (1 µg/20 µl/ratón)

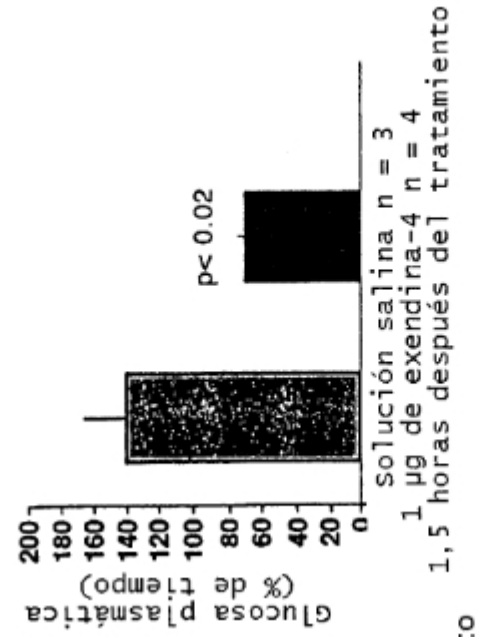


Fig. 5B

Se mantuvieron en ayunas los machos de ratón db/db (de aproximadamente 50 g) durante 2h y se intubó la tráquea con los animales anestesiados. Se extrajo sangre de los animales (75 µl, seno orbital) antes y después de que se administraran 20 µl de solución salina o de 1 µg de exendina-4 disuelta en solución salina en la tráquea de cada animal.

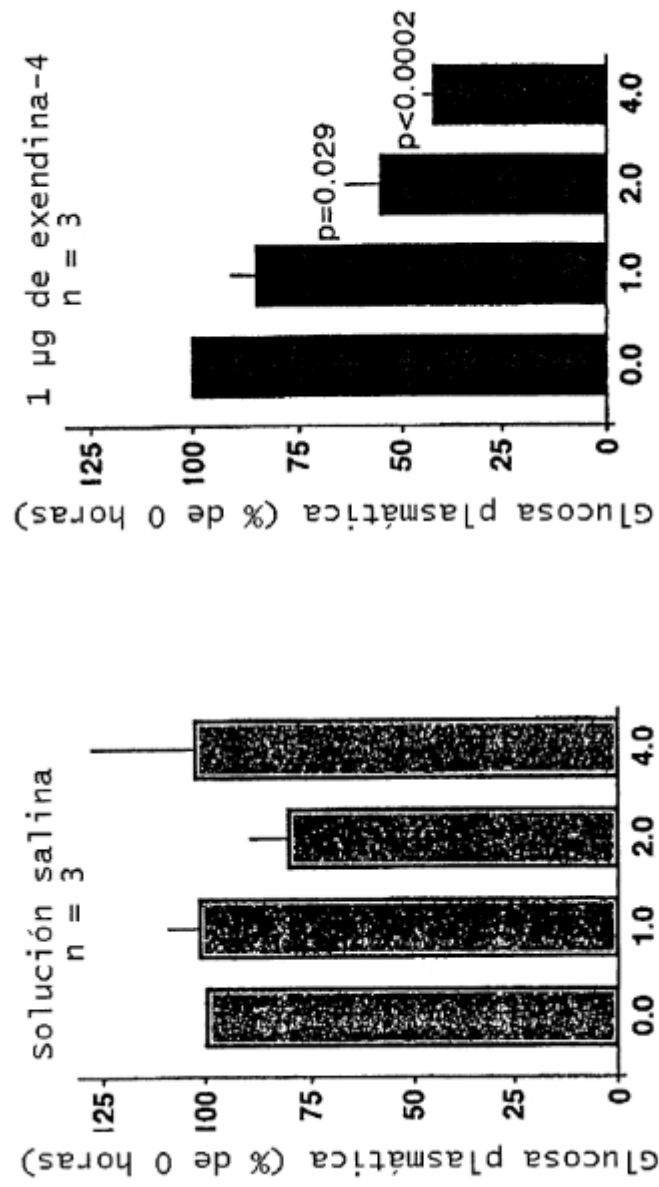


Fig. 6B

Fig. 6A

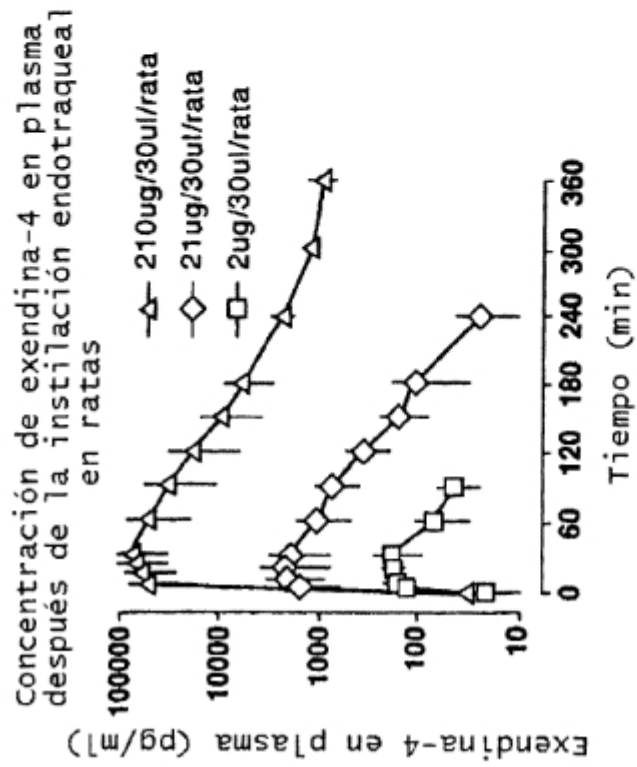


Fig. 7A

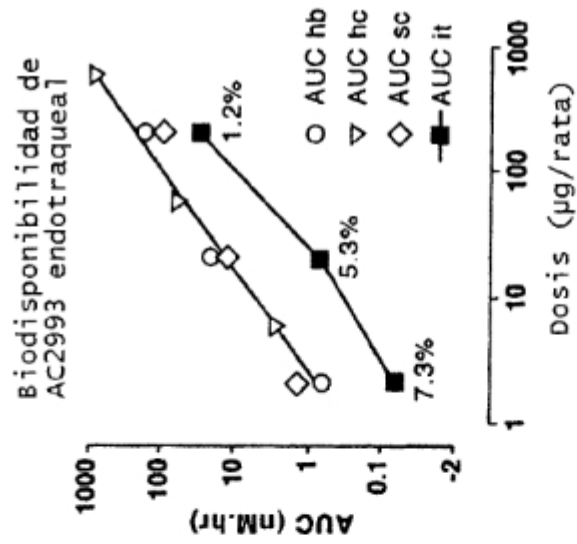
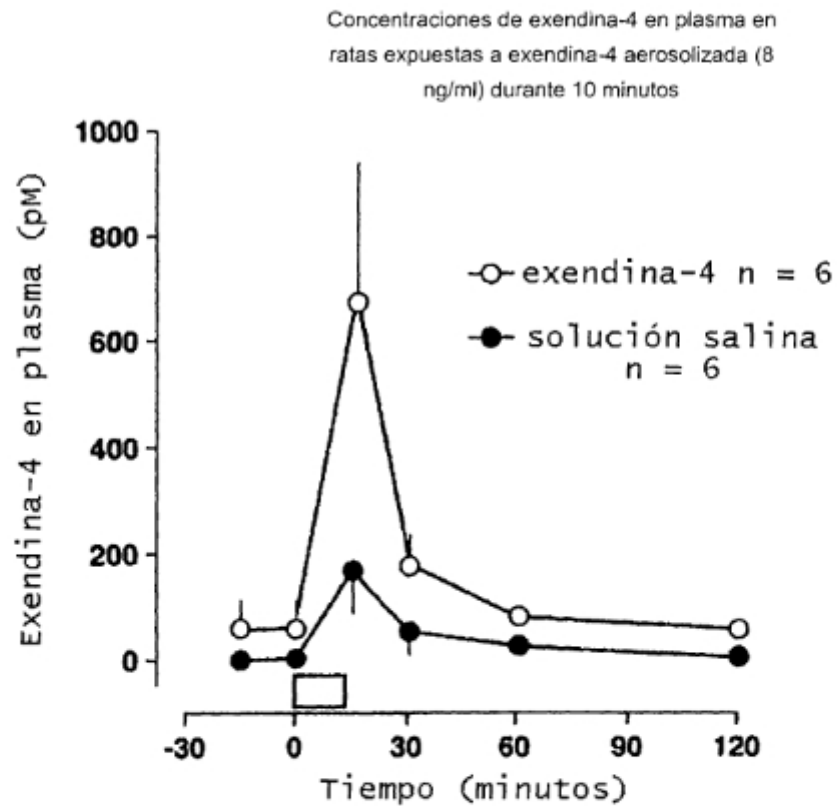


Fig. 7B



Se mantuvieron en ayunas los machos de rata (de aproximadamente 350 g cada uno), se colocaron en una cámara de 2 litros y se expusieron a la exendina-4 aerosolizada durante 10 minutos.

La exendina-4 se nebulizó en valor de 0,2 mg/min con un índice de flujo de 5 l/min.

Se realizó el cálculo de la concentración de exendina-4 aerosolizada a partir de muestras de la atmósfera de la cámara obtenidas durante el transcurso del experimento.

Fig. 8

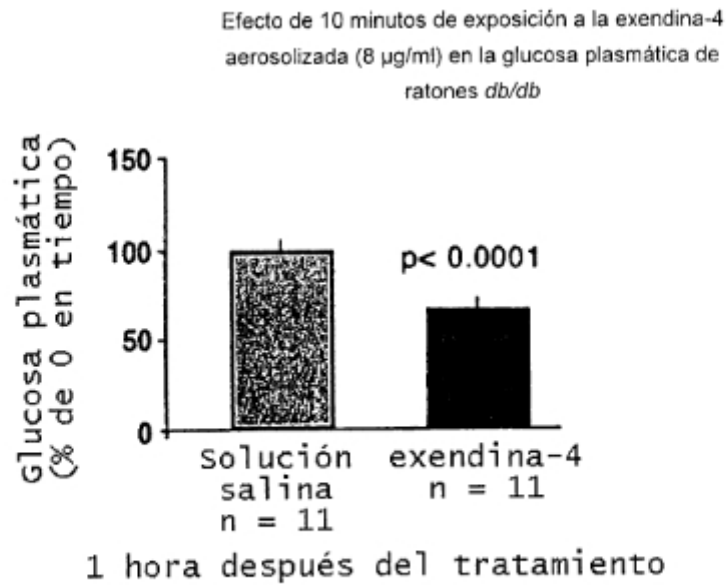


Fig. 9A

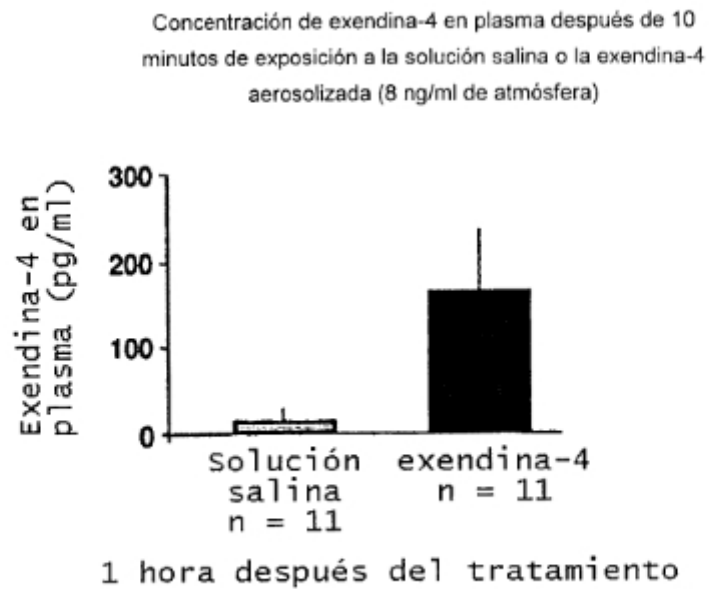
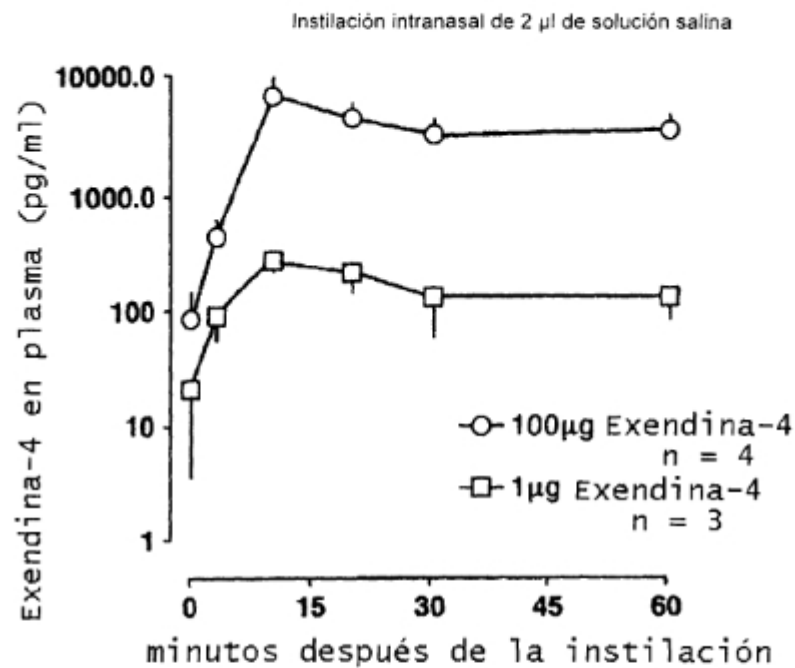


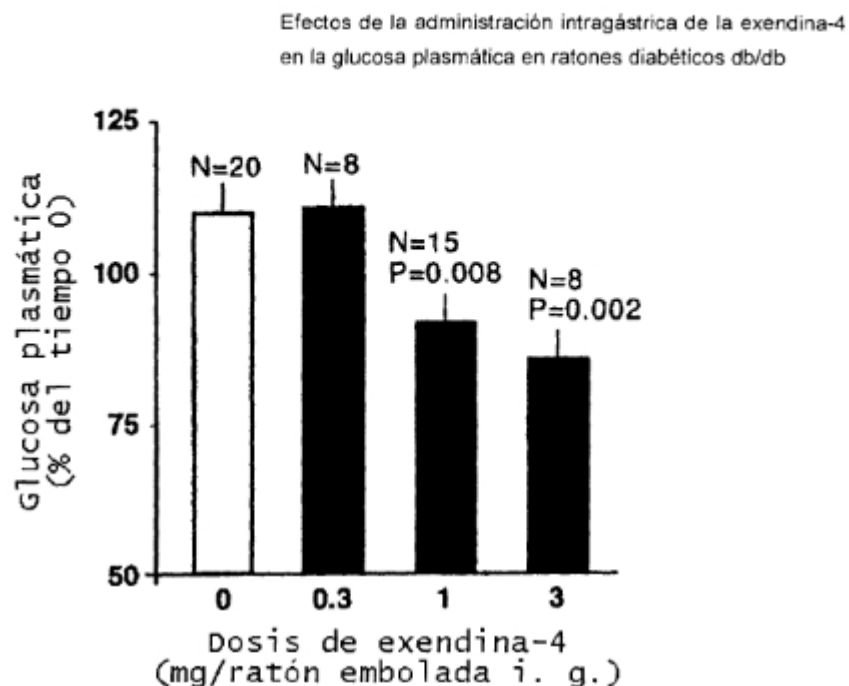
Fig. 9B



Se administró a las ratas Harlan Sprague Dawley (311 – 365 g), sin ayunar, unas dosis de 0, 1, 100 μ l de exendina-4 en 2 μ l de solución salina aplicándolas en los orificios nasales.

Se procedió a la extracción de muestras de sangre de las ratas anestesiadas (Hurricane) a partir del extremo de la cola a 0, 3, 10, 20, 30 y 60 minutos después de la administración de la exendina-4, determinándose el nivel en plasma mediante IRMA.

Fig. 10



Se mantuvieron en ayunas los machos de ratón db/db (de aproximadamente 50 g) durante 2 h y se extrajo sangre de los animales (40 μ l, seno orbitario) antes y 1 h después de que se administraran 200 μ l de solución salina o exendina-4 disuelta en solución salina por vía i. g. en cada animal.

Sublingual

La aplicación sublingual de la exendina-4 (100 μ g/5 μ l/animal) a ratones diabéticos db/db produjo una disminución del 15% en la concentración de glucosa plasmática una hora después del tratamiento. En el grupo de control al cual se le administró la solución salina se observó un incremento del 30%. El nivel medio de exendina-4 en plasma a los 60 minutos fue de 4520 ± 1846 pg/ml (ver Figura 8).

Fig. 11

Concentración de la exendina-4 en plasma después de la administración sublingual en ratones db/db (100 µg en 5 µl de embolada)

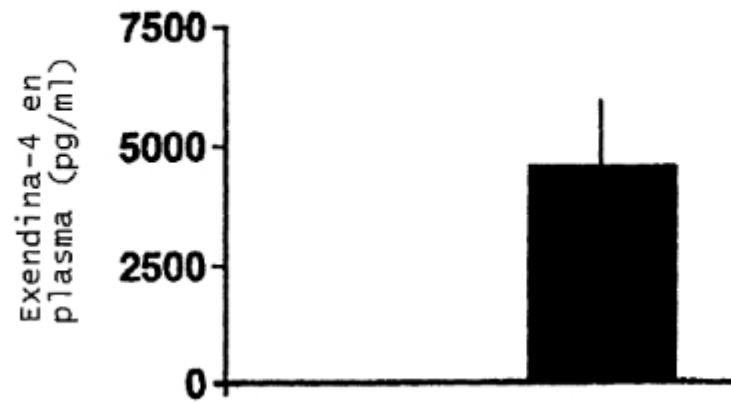


Fig. 12A

Efecto de la administración sublingual de exendina-4 (100 µg en 5 µl de embolada) en la glucosa plasmática de ratones db/db.

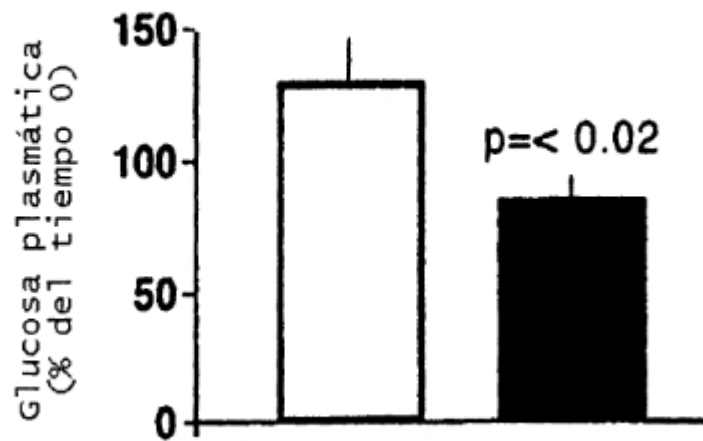
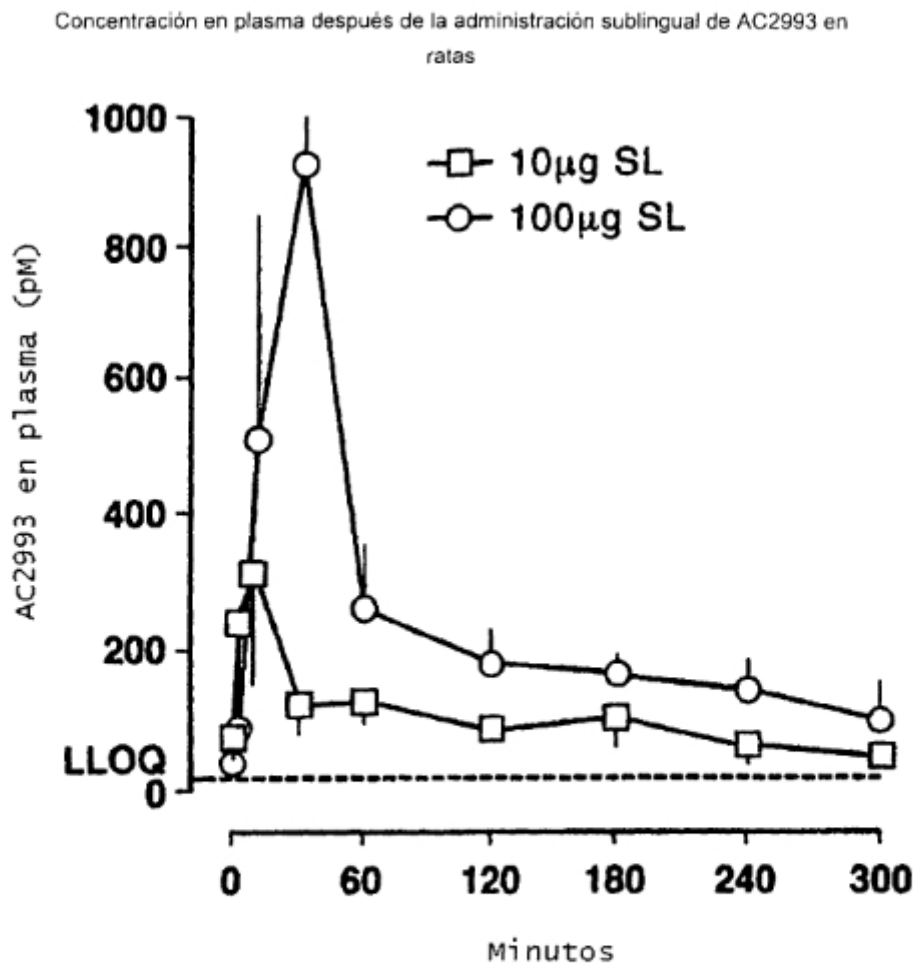


Fig. 12B



La dosis se administró en 3 µl de solución salina debajo de la lengua en ratas HSD (~300 g) anestesiadas brevemente con metofano.

Fig. 12C

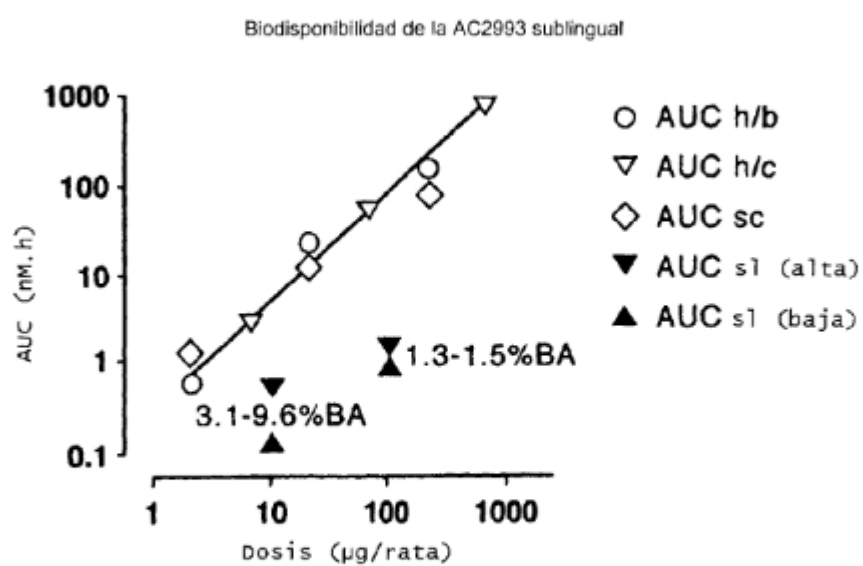


Fig. 12D

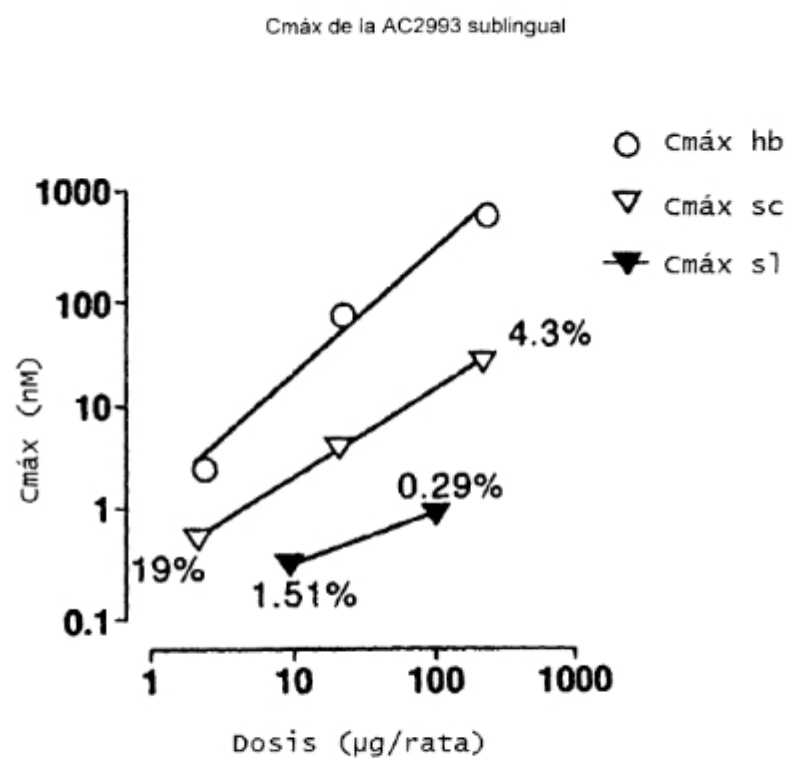


Fig. 12E

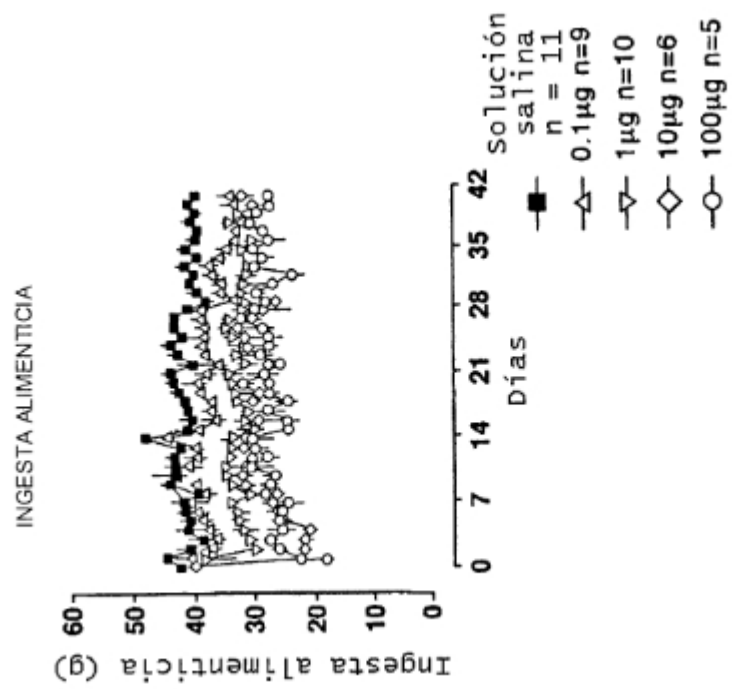


Fig. 13A1

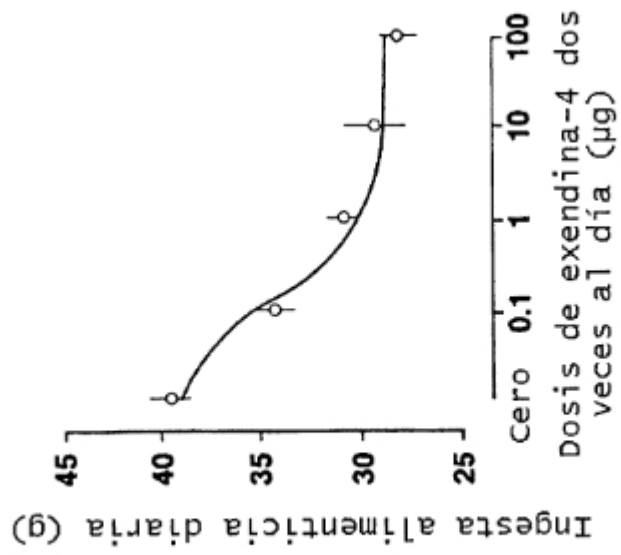


Fig. 13A2

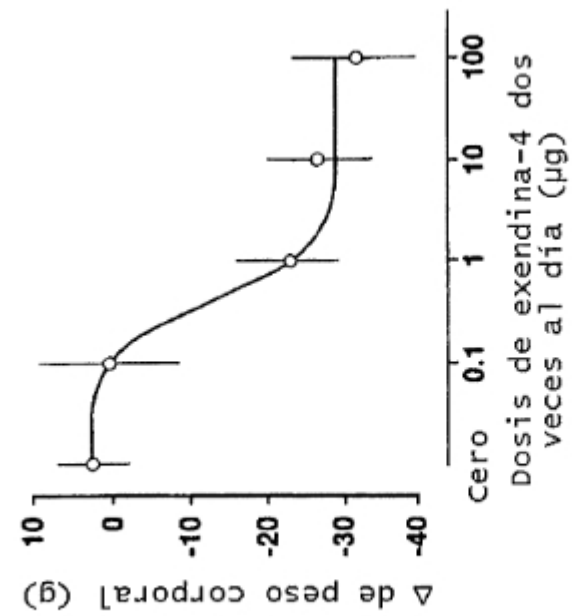


Fig. 13B2

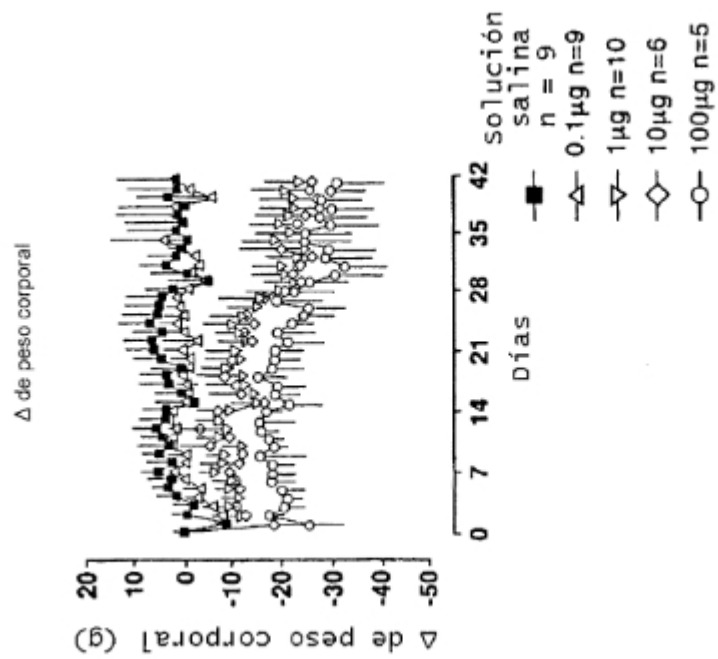


Fig. 13B1

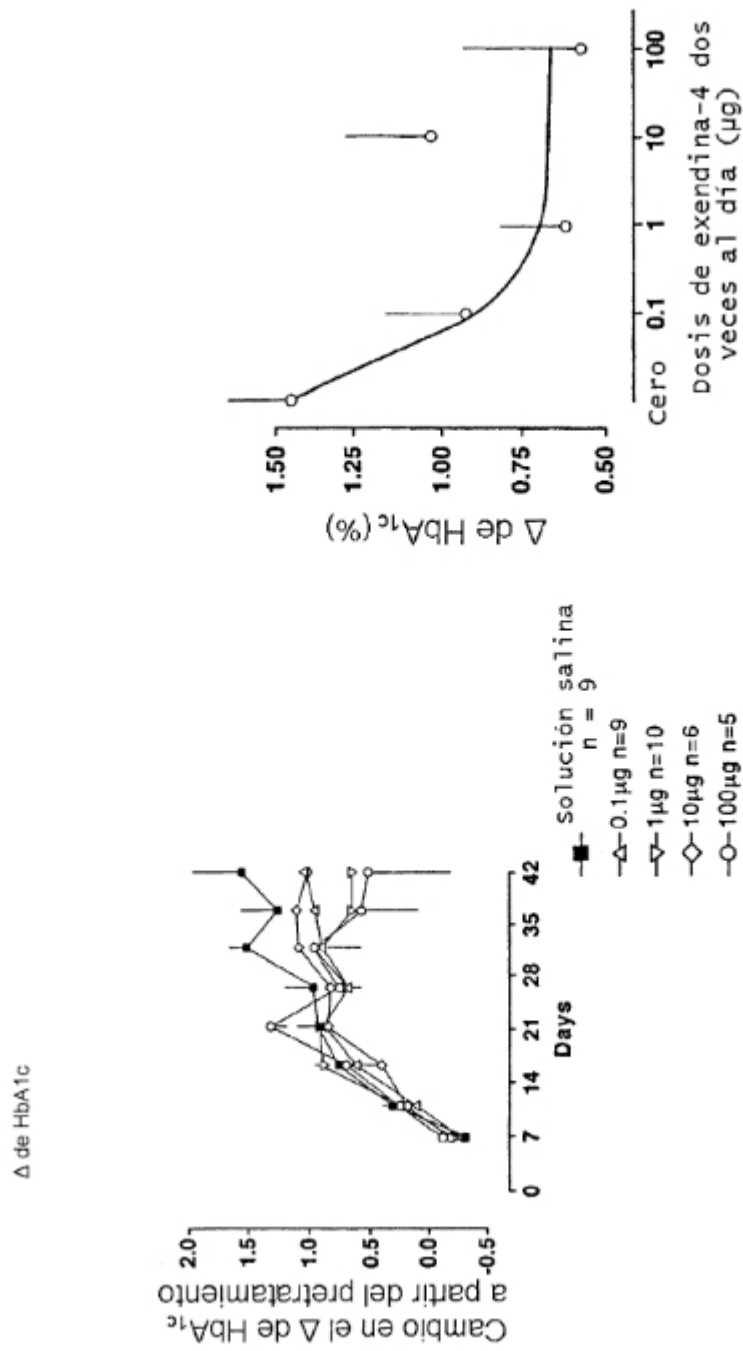


Fig. 13C1

Fig. 13C2

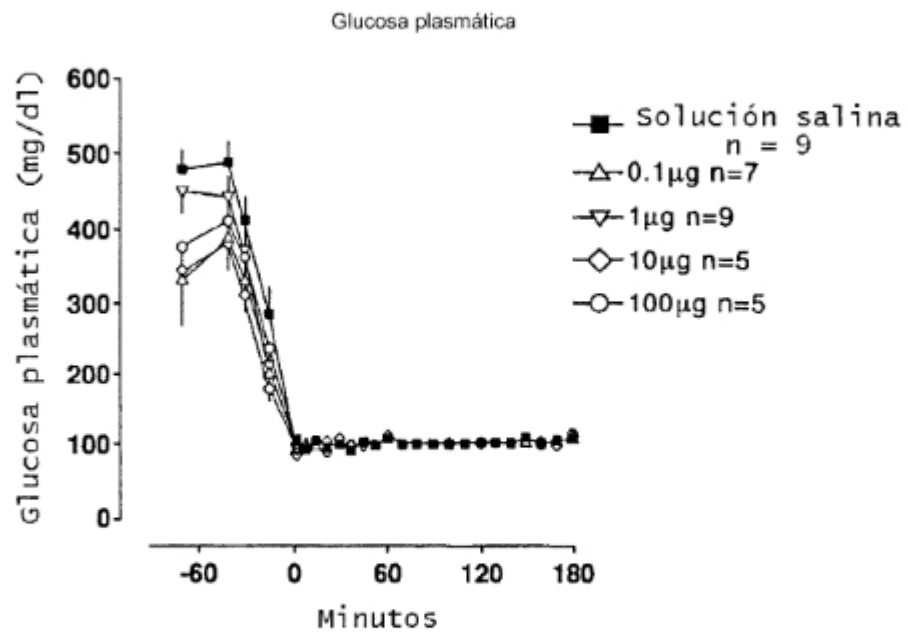


Fig. 14A

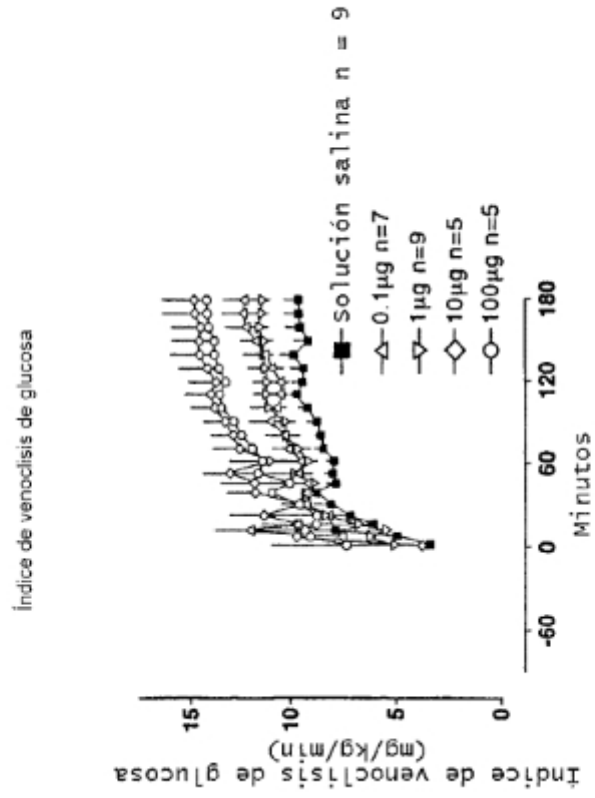


Fig. 14B1

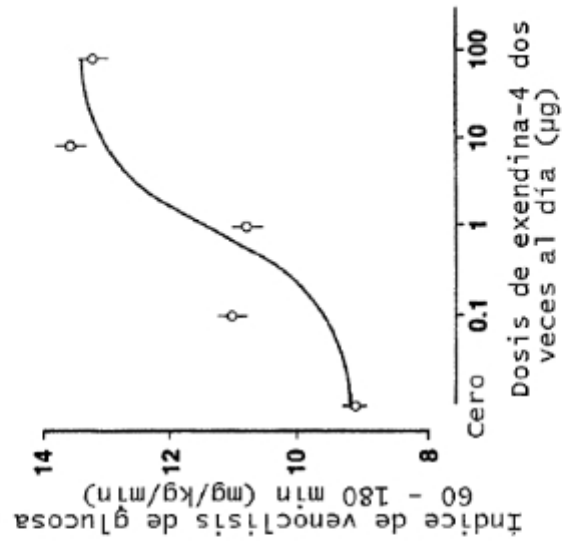


Fig. 14B2

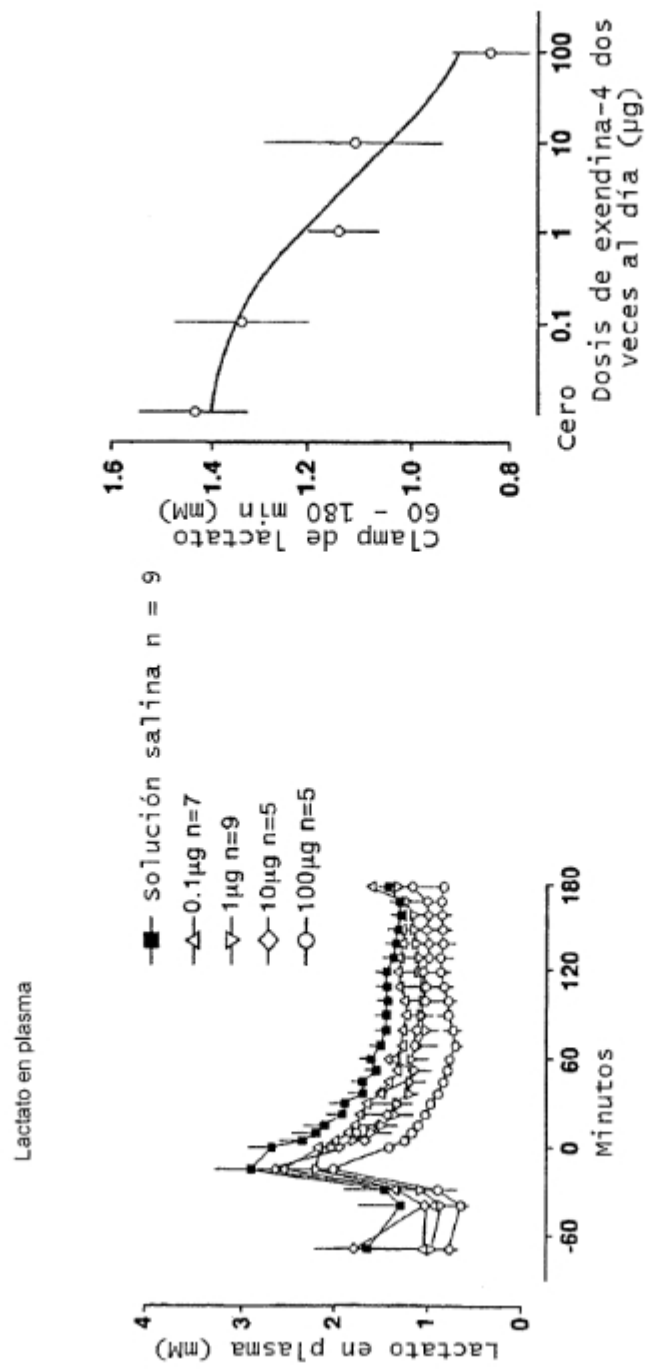


Fig. 14C1

Fig. 14C2

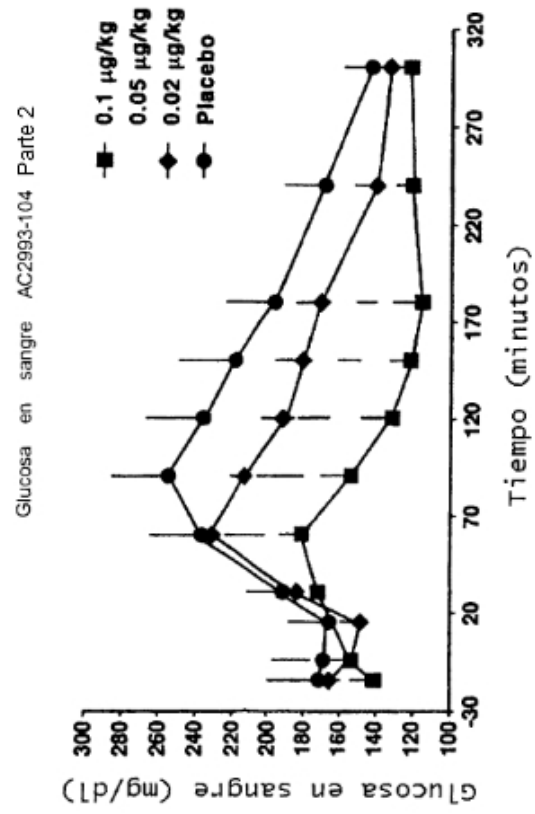


Fig. 15

Glucosa en sangre AC2993-104 Parte 2

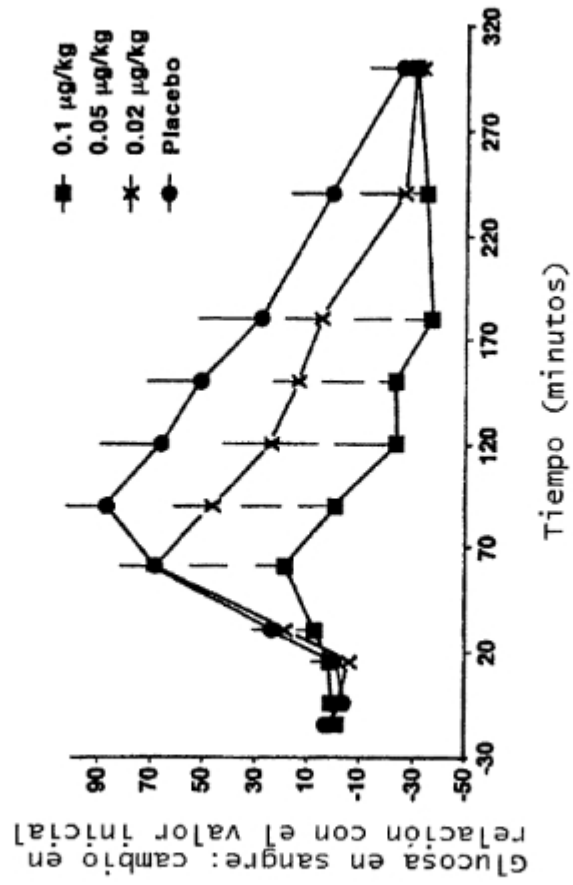


Fig. 16