



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 936**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

G03F 5/00 (2006.01)

C07K 2/00 (2006.01)

C07K 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97938261 .1**

96 Fecha de presentación : **08.08.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0966297**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.1999**

54 Título: **Métodos para regular la motilidad gastrointestinal.**

30 Prioridad: **08.08.1996 US 694954**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.05.2009

73 Titular/es: **AMYLIN PHARMACEUTICALS, Inc.**
9360 Towne Centre Drive
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es: **Young, Andrew, A.;**
Gedulin, Bronislava;
Beeley, Nigel, Robert, Arnold y
Prickett, Kathryn, S.

74 Agente: **Manresa Val, Manuel**

ES 2 319 936 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para regular la motilidad gastrointestinal.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la realización de medicamentos que regulan la motilidad intestinal. Más particularmente, la presente invención se refiere a la utilización de exendinas y determinados análogos agonistas de las mismas en la realización de medicamentos para el tratamiento de trastornos que se beneficiarán del retardo y la disminución de la velocidad del vaciado gástrico.

Antecedentes

La siguiente descripción comprende información que puede resultar útil en la comprensión de la presente invención. No significa la admisión de que cualquier información proporcionada en la presente memoria constituye una técnica anterior para la invención que se reivindica, ni que cualquiera de las publicaciones a las que se hace referencia explícita o implícitamente constituyen una técnica anterior para la presente invención.

Exendina

Las exendinas son péptidos que se encuentran en el veneno del monstruo de Gila (*Gila monster*), un lagarto que se encuentra en Arizona. La exendina-3 [SEC. ID. N.º 1] se encuentra presente en el veneno del *Heloderma horridum*, y la exendina-4 [SEC. ID. N.º 2] se encuentra en el veneno del *Heloderma suspectum* (Eng, J., et al., *J. Biol. Chem.*, 265: 20259-62, 1990; Eng, J., et al., *J. Biol. Chem.*, 267: 7402-05, 1992). 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 (Goke, et al., *J. Biol. Chem.*, 268: 19650-55, 1993). El GLP-1 [7-36] NH₂ [SEC. ID N.º 3] se conoce también como proglucagón [78-107], o simplemente con la abreviatura "GPL-1", que se puede intercambiar con GLP-1 [7-36] NH₂ a lo largo de la presente solicitud. Las secuencias de la exendina-3, la exendina-4 y el GLP-1 se representan en la figura 1. El GLP-1 presenta un efecto insulínico, estimulando la secreción de insulina de las células β del páncreas; el GLP-1 inhibe asimismo la secreción de glucagón de las células α del páncreas (Orskov, et al., *Diabetes*, 42: 658-61, 1993; D'Alessio, et al., *J. Clin. Invest.*, 97: 133-38, 1996). Se ha publicado que el GLP-1 inhibe el vaciado gástrico (Williams 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 adicional de glicina en el extremo carboxílico, estimula asimismo la secreción de insulina en los seres humanos (Orskov, et al., *Diabetes*, 42: 658-61, 1993).

Se ha clonado una proteína G transmembrana receptora de la adenilato-ciclasa que se considera responsable del efecto insulínico del GLP-1 a partir de una estirpe de células β (Thorens, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89: 8641-45 (1992)), a la que de ahora en adelante se hará referencia como "receptor del GLP-1 clonado". Se ha descrito que la exendina-4 constituye un potente agonista de 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; se ha publicado asimismo 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 descubrió 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., *Regulatory Peptides*, 41: 149-56, 1992; Raufman, et al., *J. Biol. Chem.* 267: 21432-37, 1992; Singh, et al., *Regul. Pept.* 53: 47-59, 1994). Basándose en las actividades insulínicas de la exendina-3 y de la exendina-4 se ha propuesto su utilización en el tratamiento de la diabetes mellitus y en la prevención de la hiperglucemia (Eng, patente US n.º 5.424.286).

Se ha publicado que, a diferencia de las exendinas completas, los péptidos de exendina truncados tales como la exendina [9-39], una molécula carboxiamidada, y los fragmentos desde el 3-39 hasta el 9-39 son antagonistas del GPL-1 potentes y selectivos (Goke, et al., *J. Biol. Chem.*, 268: 19650-55, 1993; Schepp, W., et al., *Eur. J. Pharm.* 269: 183-91, 1994; Montrose-Rafizadeh, et al., *Diabetes*, 45 (Suppl. 2): 152A, 1996). Se ha descrito que la exendina [9-39], cuya secuencia se representa en la figura 1, bloquea el GLP-1 endógeno *in vivo*, provocando 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). Las exendinas y la exendina [9-39] se fijan al receptor del GLP-1 clonado (Fehmann HC, et al., *Peptides* 15 (3): 453-6, 1994; Thorens B, et al., *Diabetes* 42 (11): 1678-82, 1993). En las células sometidas a transfección con el receptor del GLP-1 clonado, 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.

Se ha publicado asimismo que la exendina [9-39] actúa como antagonista de las exendinas de longitud completa, inhibiendo la estimulación de las células acinares pancreáticas por parte de 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). Se ha publicado también que la exendina [9-39] inhibe la estimulación de los niveles de insulina en plasma por parte de 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).

ES 2 319 936 T3

La patente US n.º 5.424.286 da a conocer unas composiciones farmacéuticas que comprenden exendina-3 y exendina-4 o fragmentos de las mismas y su utilización en el tratamiento de la diabetes mellitus y la prevención de la hiperglucemia.

5 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 a 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 provocada por la insulina cuando no
10 resulta posible la administración de glucosa por vía intravenosa. Sin embargo, al reducir el glucagón se reduce asimismo la motilidad del tracto gastrointestinal y se emplea también como herramienta de diagnóstico en las exploraciones radiológicas gastrointestinales. El glucagón también se ha utilizado en diversas investigaciones sobre el tratamiento de diversos trastornos gastrointestinales dolorosos relacionados con los espasmos. Daniel, *et al.* (*Br. Med. J.*, 1974, 3, 720) indicaron un alivio sintomático más rápido en la diverticulitis aguda de pacientes tratados con glucagón en
15 comparación con los 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).

20 Los métodos para regular la motilidad gastrointestinal empleando agonistas de la amilina se describen en el documento WO 95/07098, publicado el 16 de marzo de 1995.

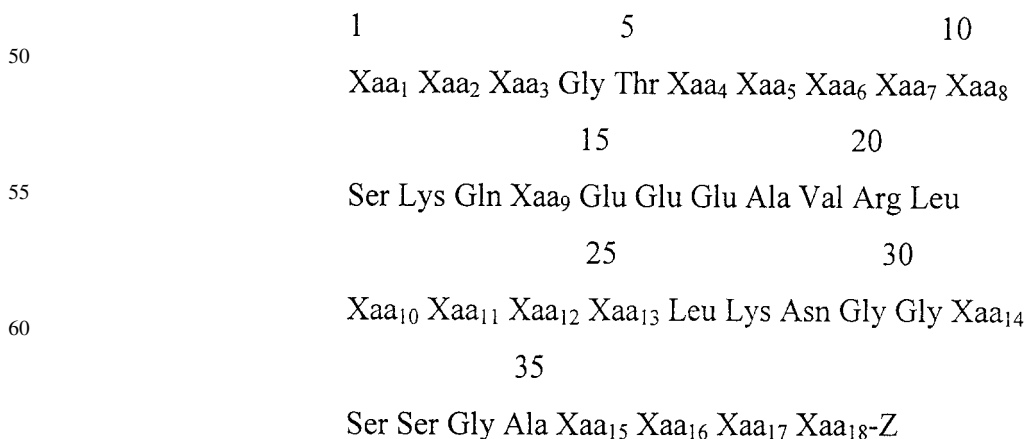
Sumario de la invención

25 La presente invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que las exendinas y los agonistas de la exendina constituyen unos potentes inhibidores del vaciado gástrico. Las exendinas y los agonistas de la exendina resultan útiles como inhibidores del vaciado gástrico en el tratamiento de, por ejemplo, la diabetes mellitus, la obesidad, la ingestión de toxinas, o para realizar diagnósticos.

30 La presente invención proporciona unos medicamentos que se pueden utilizar para reducir la motilidad gástrica y para retardar el vaciado gástrico, que comprenden una exendina, por ejemplo, la exendina 3 [SEC. ID. N.º 1], la exendina 4 [SEC. ID. N.º 2], u otros compuestos, tal como se describen en las reivindicaciones, que se enlazan efectivamente al receptor sobre el que las exendinas ejercen su acción por lo que se refiere a la motilidad gástrica y al vaciado gástrico. Éstos resultaran útiles en el tratamiento de, por ejemplo, la hiperglucemia pospandrial, una
35 complicación asociada con la diabetes mellitus de tipo 1 (insulinodependiente) y de tipo 2 (no insulinodependiente).

En un primer aspecto, la presente invención proporciona la utilización de una exendina o análogo agonista de la exendina en la realización de un medicamento para utilizar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que puede
40 aprovechar un descenso de la motilidad gastrointestinal o un retardo en el vaciado gástrico, seleccionándose dicha enfermedad de entre la diverticulitis aguda, el síndrome de evacuación gástrica rápida pospandrial, la hiperglucemia pospandrial asociada a la diabetes mellitus de tipo 1, o la hiperglucemia pospandrial asociada a la diabetes mellitus de tipo 2, provocando dicha exendina o análogo agonista de la exendina la reducción de la motilidad gástrica o el retardo del vaciado gástrico,

45 siendo dicha exendina o análogo agonista de la exendina el compuesto de fórmula:



en la que Xaa₁ es His, Arg o Tyr; Xaa₂ es Ser, Gly, Ala o Thr; Xaa₃ es Asp o Glu; Xaa₄ es Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa₅ es Thr o Ser; Xaa₆ es Ser o Thr; Xaa₇ es Asp o Glu; Xaa₈ es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met; Xaa₉ es Leu,

ES 2 319 936 T3

Ile, pentilglicina, Val o Met; Xaa₁₀ es Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa₁₁ es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met; Xaa₁₂ es Glu o Asp; Xaa₁₃ es Trp, Phe, Tyr, o naftilalanina; Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆, Xaa₁₇ son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquilentilglicina o N-alquilalanina; Xaa₁₈ es Ser, Thr o Tyr; y Z es -OH o -NH₂; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En una forma de realización, la presente invención se puede utilizar para reducir la motilidad gástrica. En otra forma de realización, la presente invención se puede utilizar para retardar el vaciado gástrico.

La presente invención se puede utilizar para reducir la motilidad gástrica en un paciente que padezca un trastorno gastrointestinal, por ejemplo, espasmos (que se pueden asociar a la diverticulitis aguda, un trastorno del conducto biliar o un trastorno del esfínter de Oddi).

En otro aspecto la presente invención se refiere a la utilización de una exendina o de un análogo agonista de la exendina tal como se ha definido anteriormente en un procedimiento de diagnóstico gastrointestinal proporcionando dicha exendina o agonista de la exendina una regulación beneficiosa de la motilidad intestinal, por ejemplo en un examen radiológico o mediante resonancia magnética nuclear.

En otro aspecto, se puede administrar asimismo al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista de la amilina. En un aspecto preferido el agonista de la amilina es una amilina o un análogo agonista de la amilina tal como la ^{25,28,29}Pro-amilina humana. La utilización de agonistas de la amilina para tratar la hiperglucemia pospandrial, así como para regular beneficiosamente la motilidad intestinal, se describen en el documento WO 95/07098.

En otro aspecto adicional, se puede administrar asimismo al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de insulina o de un análogo de la insulina, por separado o junto con una exendina o análogo de la exendina.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de una exendina o análogo de un agonista de la exendina tal como se ha definido anteriormente en la realización de un medicamento para utilizar en el tratamiento ante la ingestión de una toxina proporcionando dicha exendina o análogo agonista de la exendina una regulación beneficiosa de la motilidad gastrointestinal.

La presente invención proporciona además una exendina o un análogo agonista de la exendina tal como se ha definido anteriormente para utilizar en:

(a) el tratamiento de una enfermedad o trastorno que se puede beneficiar de una disminución de la motilidad intestinal o de un retardo en el vaciado gástrico, seleccionándose dicha enfermedad o trastorno de entre la diverticulitis aguda, el síndrome de evacuación gástrica rápida pospandrial, la hiperglucemia pospandrial asociada a una tolerancia disminuida a la glucosa, la hiperglucemia pospandrial asociada a la diabetes mellitus de tipo 1, o la hiperglucemia pospandrial asociada a la diabetes mellitus de tipo 2;

proporcionando dicha exendina o análogo agonista de la exendina la reducción de la motilidad gástrica o el retardo en el vaciado gástrico; o

(b) el tratamiento ante la ingestión de una toxina, proporcionando dicha exendina o análogo agonista de la exendina una regulación beneficiosa de la motilidad gastrointestinal.

Definiciones

Según la presente invención y tal como se emplean en el presente documento, los siguientes términos se definen con los siguientes significados excepto cuando se establezca de otro modo.

El término “agonista de la exendina” se refiere a un compuesto que imita los efectos de la exendina por lo que se refiere a la motilidad gástrica y al vaciado gástrico, particularmente un compuesto que se enlaza efectivamente con el receptor en el que las exendinas ejercen su acción en la motilidad gástrica y el vaciado gástrico, preferentemente un análogo o derivado de una exendina.

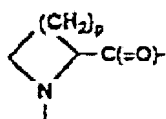
El término “aminoácido” se refiere a los aminoácidos naturales, los aminoácidos sintéticos y los análogos de los aminoácidos, todos ellos en sus estereoisómeros D y L si su estructura permite dichas formas estereoisómeras. Los aminoácidos naturales comprenden la alanina (Ala), la arginina (Arg), la asparagina (Asn), el ácido aspártico (Asp), la cisteína (Cys), la glutamina (Gln), el ácido glutámico (Glu), la glicina (Gly), la histidina (His), la isoleucina (Ile), la leucina (Leu), la lisina (Lys), la metionina (Met), la fenilalanina (Phe), la prolina (Pro), la serina (Ser), la treonina (Thr), el triptófano (Trp), la tirosina (Tyr) y la valina (Val). Los aminoácidos sintéticos comprenden, sin limitarse a los mismos, el ácido azetidinecarboxílico, el ácido 2-aminoadípico, el ácido 3-aminoadípico, la β -alanina, el ácido amino-propiónico, el ácido 2-aminobutírico, el ácido 4-aminobutírico, el ácido 6-aminocaproico, el ácido 2-aminoheptanoico, el ácido 2-aminoisobutírico, el ácido aminoisobutírico, el ácido 2-aminopimélico, la butilglicina terciaria, el ácido 2,4-diaminoisobutírico, la desmosina, el ácido 2,2'-diaminopimélico, el ácido 2,3-diaminopropiónico, la N-etilglicina, la N-etilasparagina, la homoprolina, la hidroxilisina, la alo-hidroxilisina, la 3-hidroxi prolina, la 4-hidroxi prolina, la iso-desmosina, la alo-isoleucina, la N-metilalanina, la N-metilglicina, la N-metilisoleucina, la N-metilpentilglicina, la N-metilvalina, la naftalanina, la norvalina, la norleucina, la ornitina, pentilglicina, el ácido pipercolico y la tioprolina.

ES 2 319 936 T3

Los análogos de los aminoácidos comprenden los aminoácidos naturales y sintéticos que se encuentran químicamente bloqueados, reversible o irreversiblemente, o que se han modificado en su grupo amino N-terminal o en sus grupos de cadena lateral, tal como por ejemplo, el sulfóxido de metionina, la metionina sulfona, la S-(carboximetil)-cisteína, el sulfóxido de S-(carboximetil)-cisteína y la S-(carboximetil)-cisteína sulfona.

El término “análogo de un aminoácido” se refiere a un aminoácido en el que el grupo carboxilo carboxiterminal, el grupo amino aminoterminal o el grupo funcional de cadena lateral se han codificado químicamente en otro grupo funcional. Por ejemplo el ácido aspártico - (β -metil éster) es un análogo aminoácido del ácido aspártico; la N-etilglicina es un análogo aminoácido de la glicina; o la alanina carboxamida es un análogo aminoácido de la alanina.

El término “residuo aminoácido” se refiere a radicales que presentan la estructura (1) $-C(O)-R-NH-$, en la que R normalmente es $-CH(R')$, en la que R' es una cadena lateral del aminoácido, normalmente H o un carbono que contiene un sustituyente; o (2),



en el que p es 1, 2 ó 3 representando respectivamente residuos del ácido azetidinecarboxílico, de la prolina o del ácido pipercolico.

El término “inferior” al que se hace referencia en el presente documento en relación con los radicales orgánicos tales como los grupos alquilo define dichos grupos comprendiendo hasta aproximadamente 6 átomos de carbono inclusive, preferentemente hasta 4 átomos de carbono inclusive y ventajosamente uno o dos átomos de carbono. Dichos grupos pueden ser de cadena lineal o de cadena ramificada.

“Sal farmacéuticamente aceptable” comprende las sales de los compuestos descritos en el presente documento derivadas de la combinación de dichos compuestos y un ácido orgánico o inorgánico. En la práctica, el uso de la sal forma cantidades para utilizar en forma de base. Los compuestos resultan útiles tanto en forma de base libre como en forma de sal, considerándose ambas formas comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

Además, las siguientes abreviaciones se aplican a los siguientes compuestos:

“ACN” o “CH₃CN” se refiere al acetonitrilo.

“Boc”, “tBoc” o “Tboc” se refiere al t-butoxi carbonilo.

“DCC” se refiere a la N,N'-1-diciclohexilcarbodiimida.

“Fmoc” se refiere al fluorenilmetoxycarbonilo.

“HBTU” se refiere al hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametilurano.

“HOBt” se refiere al monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol.

“homoP” o “hPro” se refiere a la homoprolina.

“MeAla” o “Nme” se refiere a la N-metilalanina.

“naph” se refiere a la naftilalanina.

“pG” o “pGly” se refiere a la pentilglicina.

“tBuG” se refiere a la butilglicina terciaria.

“ThioP” o “tPro” se refiere a tioprolina.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa una comparación entre las secuencias de los aminoácidos la exendina 3, la exendina 4 y la exendina [9-39] utilizando los códigos estándar de una sola letra en vez de los códigos de tres letras para los aminoácidos.

La figura 2 representa los efectos dosis - respuesta del GLP-1 [7-36] NH₂, la exendina-3 y la exendina-4 de la inyección subcutánea previa sobre la retención del contenido gástrico 20 minutos tras la alimentación mediante sonda

ES 2 319 936 T3

nasogástrica en ratas normales (n = 3-17 para cada punto). Los símbolos indican las medias ± el error estándar de la media y las curvas definen las funciones logísticas con un mejor ajuste. “Cero” indica la fracción de contenido gástrico retenido en ratas normales sin tratar.

5 La figura 3 representa los efectos dosis - respuesta de la inyección previa de exendina-4 (n = 29), exendina-4 ácida (n = 36) y ¹⁴Leu, ²⁵Phe exendina-4 (n = 36) en la retención del contenido gástrico 20 minutos tras la alimentación mediante sonda nasogástrica en ratas normales. Los símbolos indican las medias + el error estándar de la media y las curvas definen las funciones logísticas con un mejor ajuste. “Cero” indica la fracción de contenido gástrico retenido en ratas normales sin tratar.

10 La figura 4 representa el efecto de la inyección previa de 1,0 µg de exendina-4 (sc), n = 6; 1,0 µg de exendina-4 (sc) más 0,3 mg de exendina [9-39] (sc) n = 6; y 0,3 mg de exendina [9-39] (sc) n = 6 en la retención del contenido gástrico 20 minutos tras la alimentación mediante sonda nasogástrica. Se representan asimismo los controles con disolución salina en t = 0 y t = 20 minutos. Las barras de error representan el error estándar de la media. Tal como se representa en la figura 4, la exendina-4 por si sola inhibió intensamente el vaciado gástrico. La exendina [9-39] (sc) por si sola no ejerció efecto alguno en el vaciado gástrico. Cuando se inyectó junto con la exendina-4, la exendina [9-39] no antagonizó con el efecto de la exendina-4 en la inhibición del vaciado gástrico.

15 La figura 5 representa el efecto de la inyección previa de 0,3 µg de exendina-4 (sc), n = 5 y 0,3 µg de exendina-4 (sc) más 0,5 mg de exendina [9-39] (iv), n = 5 en la retención del contenido gástrico 20 minutos tras la alimentación mediante sonda nasogástrica. Se representan asimismo los controles con disolución salina en t = 0 y t = 20 minutos. Las barras de error representan el error estándar de la media. Tal como se representa en la figura 5, la exendina-4 por si sola inhibió intensamente el vaciado gástrico. Cuando se inyectó junto con la exendina-4, la exendina [9-39] (iv) no antagonizó con el efecto de la exendina-4 en la inhibición del vaciado gástrico.

20 La figura 6 representa el efecto de la inyección previa de 10 µg de GLP-1 [7-36] NH₂ (sc), n = 8; 10 µg GLP-1 [7-36] NH₂ (sc) más 0,3 mg de exendina [9-39] (sc) n = 6; y 0,3 mg de exendina [9-39] (sc), n = 6 en la retención del contenido gástrico 20 minutos tras la alimentación mediante sonda nasogástrica. Se representan asimismo los controles con disolución salina en t = 0 y t = 20 minutos. Las barras de error representan el error estándar de la media. Tal como se representa en la figura 6, el GLP-1 [7-36] NH₂ inhibió intensamente el vaciado gástrico. La exendina [9-39] (sc) por si sola no ejerció efecto alguno en el vaciado gástrico. Cuando se inyectó junto con el GLP-1 [7-36] NH₂, la exendina [9-39] no antagonizó con el efecto del GLP-1 [7-36] NH₂ en la inhibición del vaciado gástrico.

25 La figura 7 representa el efecto de la inyección previa de 10 µg de GLP-1 [7-36] NH₂ (sc), n = 8 y 10 µg GLP-1 [7-36] NH₂ (sc) más 0,3 mg de exendina [9-39] (iv), n = 3 en la retención del contenido gástrico 20 minutos tras la alimentación mediante sonda nasogástrica. Se representan asimismo los controles con disolución salina en t = 0 y t = 20 minutos. Las barras de error representan el error estándar de la media. Tal como se representa en la figura 7, el GLP-1 [7-36] NH₂ por sí solo inhibió intensamente el vaciado gástrico. La exendina [9-39] (sc) por si sola no ejerció efecto alguno en el vaciado gástrico. Cuando se inyectó junto con el GLP-1 [7-36] NH₂, la exendina [9-39] (iv) no antagonizó con el efecto del GLP-1 [7-36] NH₂ en la inhibición del vaciado gástrico.

30 Las figuras 8-1 y 8-2 representan las secuencias de aminoácidos de determinados agonistas de la exendina [SEC. ID n.º 5 a 35].

45 Descripción detallada de la invención

Las exendinas y los agonistas de la exendina (entre ellos los análogos de la exendina y los derivados de la exendina) resultan útiles en la presente invención a la vista de sus propiedades farmacológicas. La actividad como antagonistas de la exendina se puede indicar mediante la actividad en los ensayos descritos posteriormente. Los efectos de las exendinas o de los agonistas de la exendina en la motilidad gástrica y en el vaciado se pueden identificar, determinar, o seleccionar utilizando los métodos descritos en los ejemplos 1 a 3 posteriores, u otros procedimientos conocidos en la técnica par determinar la motilidad gástrica. El análisis de receptores negativos o pruebas de detección sistemática de compuestos agonistas de la exendina o compuestos candidatos a agonistas de la exendina, tal como un análisis/prueba de detección sistemática del receptor de la amilina GPL-1 utilizando una preparación con el receptor de la amilina se describe en la patente US n.º 5.264.372, publicada el 23 de noviembre de 1993, uno o más análisis/pruebas de detección sistemática utilizando, por ejemplo, células T47D y MCF7 de carcinoma de mama, que contienen receptores del calcio asociados a la estimulación de la adenilciclase y/o un análisis/prueba de detección sistemática del receptor de CGRP utilizando, por ejemplo, células SK-N-MC, se pueden utilizar para determinar y/o confirmar la actividad del agonista de la exendina.

60 Uno de dichos procedimientos destinados a la identificación o el análisis de un compuesto para disminuir la motilidad gástrica comprende: (a) reunir una muestra analítica y un sistema analítico, comprendiendo la muestra analítica uno o más compuestos a analizar, comprendiendo el sistema analítico un sistema destinado a analizar la motilidad gástrica, caracterizándose el sistema en que presenta, por ejemplo, un nivel elevado de glucosa plasmática como respuesta a la introducción en el sistema de glucosa o de comida; y (b) determinar la presencia o el nivel del incremento de glucosa plasmática en el sistema. Se pueden utilizar asimismo controles positivos y/o negativos.

ES 2 319 936 T3

Las exendinas y agonistas de la exendina tales como los análogos de la exendina y los derivados de la exendina, descritos en el presente documento se pueden preparar empleando técnicas de purificación de péptidos tal como se describen, por ejemplo, en Eng, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265: 20259-62, 1990; y Eng, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267: 7402-05, 1992. Alternativamente, se pueden preparar los péptidos de las exendinas y de los agonistas de la exendina mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia tales como, por ejemplo, los que se describen en Raufman, *et al.*, (*J. Biol. Chem.* 267: 21432-37, 1992), utilizando técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida normales y preferentemente un sintetizador de péptidos automático o semiautomático. Por regla general, se enlazan un aminoácido protegido por el grupo α -N-carbamoilo y un aminoácido unido a la cadena peptídica en crecimiento, a una resina, a temperatura ambiente en un disolvente inerte tal como la dimetilformamida, la N-metilpirrolidinona o el cloruro de metileno en presencia de agentes de enlace tales como la dicitclohexilcarbodiimida y el 1-hidro-zibenzotriazol en presencia de una base tal como la diisopropiletilamina. El grupo protector α -N-carbamoilo se elimina del complejo resina - péptido que se ha producido empleando un reactivo tal como el ácido trifluoacético o la piperidina, y la reacción de enlace se repite con el siguiente aminoácido N-protegido que se pretende añadir a la cadena peptídica. Los grupos N-protectores aptos resultan muy conocidos en la técnica, siendo los preferidos en el presente documento el t-butiloxicarbonil (tBoc) y el fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).

Los disolventes, los derivados de aminoácidos y la resina de 4-metilbenzidril-amina utilizados en el sintetizador de péptidos se pueden adquirir en Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA). Los siguientes aminoácidos protegidos por cadena lateral tales como 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) se pueden adquirir en Applied Biosystems, Inc. La Boc-His (BOM) puede adquirirse en Applied Biosystems, Inc. o en Bachem Inc. (Torrance, CA). El anisol, el sulfuro de metilo, el fenol, el etanoditiol, y el tioanisol se pueden obtener 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 se puede realizar 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 (véase, *Applied Biosystems User's Manual* ["Manual del usuario de Applied Biosystems"] 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. La escisión de las resinas peptídicas Boc puede realizarse con HF (-5°C a 0°C, 1 hora). El péptido se puede extraer de la resina alternando con agua y ácido acético, y liofilizando los filtrados. La escisión de las resinas de péptido - Fmoc se puede realizar según los procedimientos estándar (*Introduction to Cleavage Techniques* ["Introducción a las técnicas de escisión"], Applied Biosystems, Inc., 1990, p. 6-12). Los péptidos también se pueden ensamblar asimismo empleando un sintetizador Advanced Chem Tech Synthesizer (Modelo MPS 350, Louisville, Kentucky). Los péptidos se pueden purificar mediante RP-HPLC (de preparación y analítica) utilizando un sistema Waters Delta Prep 3000. Para aislar los péptidos se puede emplear una columna de preparación C4, C8 o C18 (10 μ , 2,2 x 25 cm; Vydac, Hesperia, CA) y la pureza se puede determinar 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) se pueden trasladar 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 se pueden realizar en un sistema Waters Pico Tag y procesar empleando el programa Maxima. Los péptidos se pueden hidrolizar mediante hidrólisis ácida en fase de vapor (115°C, 20-24 h). Se pueden derivar los hidrolizados y analizarse mediante procedimientos 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"], pág. 11-52, Millipore Corporation, Milford, MA). El bombardeo de átomos rápidos se puede realizar 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.

Los compuestos peptídicos útiles en la presente invención se pueden preparar asimismo empleando técnicas de ADN recombinante, utilizando procedimientos conocidos actualmente en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* ("Clonación molecular: manual de laboratorio"), 2ª Ed., Cold Spring Harbor (1989). Alternativamente, dichos compuestos se pueden preparar mediante procedimientos de síntesis de péptidos en fase homogénea.

La utilización de determinados análogos agonistas o derivados de la exendina está comprendido en la presente invención. Los análogos o derivados de la exendina son variantes funcionales que presentan una secuencia de aminoácidos similar y conservan, hasta un cierto grado, por lo menos las actividades relacionadas con la motilidad gástrica y el vaciado gástrico. Por "variante funcional" se entiende un análogo o derivado que presenta una actividad que se puede sustituir mediante una o más actividades de una exendina particular. Las variantes funcionales preferidas conservan todas las actividades de una exendina particular, sin embargo, la variante funcional puede presentar una actividad que, cuando se mide cuantitativamente, es más potente o más débil, tal como se determina en ensayos funcionales de la exendina, por ejemplo. Las variantes funcionales preferidas presentan unas actividades que se encuentran comprendidas entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 10.000% de la actividad de la exendina relacionada, preferentemente entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 1000% y más preferentemente entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 500%. Los derivados presentan por lo menos un 15% de similitud en la secuencia, preferentemente aproximadamente el 70%, más preferentemente aproximadamente el 90% y más preferentemente aún aproximadamente el 95% de similitud de la secuencia con la exendina relacionada. "Similitud en la

ES 2 319 936 T3

secuencia” se refiere a la “homología” observada en las secuencias de aminoácido de dos polipéptidos distintos, con independencia del origen del polipéptido.

5 La capacidad del análogo o derivado para conservar una cierta actividad se puede determinar utilizando técnicas descritas en la presente memoria.

10 Los derivados comprenden la modificación que se produce durante o tras la traducción, por ejemplo, mediante fosforilación, glucosilación, reticulación, acilación, escisión proteolítica, enlace con una molécula de un anticuerpo, molécula de membrana u otro ligando (véase Ferguson *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* 57: 285-320, 1988).

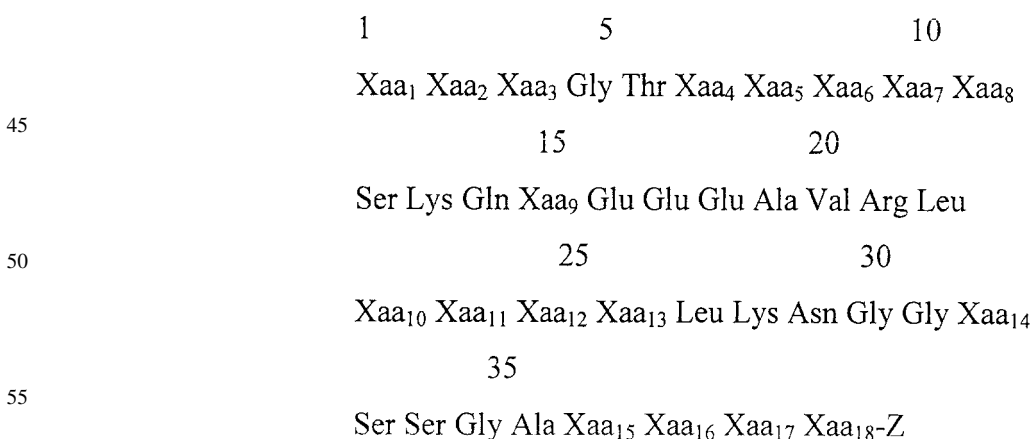
15 Los tipos específicos de análogos comprenden alteraciones en los aminoácidos tales como eliminaciones, sustituciones, adiciones y modificaciones de aminoácidos. El término “eliminación” se refiere a la ausencia de uno o más residuo(s) de aminoácidos en el polipéptido relacionado. El término “adición” se refiere a la presencia de uno o más residuo(s) de aminoácidos en el polipéptido relacionado. Las adiciones y eliminaciones a un polipéptido se pueden realizar en el extremo aminoterminal, en el extremo en el carboxiterminal y/o en una zona interior. La “modificación” de un aminoácido se refiere a la alteración de un aminoácido natural para producir un aminoácido sintético. El término “sustitución” se refiere a la sustitución de uno o más residuo(s) de aminoácidos en el polipéptido. Los análogos pueden comprender distintas combinaciones de alteraciones que comprendan más de una alteración y distintos tipos de alteraciones.

20 Los análogos preferidos presentan una o más alteraciones en los aminoácidos que no afectan significativamente a la actividad agonista de la exendina. En las regiones de la exendina que no resultan necesarias para la actividad agonista de la exendina, los aminoácidos se pueden eliminar, añadir o sustituir con un menor riesgo de afectar a la actividad. En las regiones requeridas para la actividad agonista de la exendina, las alteraciones en los aminoácidos resultan menos preferidas ya que existe un riesgo superior de afectar a la actividad de la exendina. Dichas alteraciones han de ser alteraciones conservativas. Por ejemplo, uno o más residuos aminoácidos de la secuencia se pueden sustituir por otro aminoácido con una polaridad similar que actúa como variante funcional.

30 Las regiones conservadas tienden a ser más importantes para la actividad de las proteínas que las regiones no conservadas. Se pueden utilizar procedimientos conocidos para determinar las regiones conservadas y no conservadas importantes de la actividad del receptor utilizando técnicas de mutagenia *in vitro* o análisis de eliminación y determinación de la actividad del receptor tal como se describe mediante la presente descripción.

35 Las modificaciones de un polipéptido específico pueden ser intencionadas, tal como mediante una mutagenia dirigida o la sustitución de aminoácidos durante la síntesis en fase sólida, o pueden ser accidentales, tal como mutaciones en anfitriones o sistemas que producen el polipéptido.

40 Los compuestos útiles según la presente invención son compuestos agonistas de la exendina de fórmula (I) [SEC. ID. N.º 4]:



60 en la que Xaa₁ es His, Arg o Tyr; Xaa₂ es Ser, Gly, Ala o Thr; Xaa₃ es Asp o Glu; Xaa₄ es Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa₅ es Thr o Ser; Xaa₆ es Ser o Thr; Xaa₇ es Asp o Glu; Xaa₈ es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met; Xaa₉ es Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met; Xaa₁₀ es Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa₁₁ es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met; Xaa₁₂ es Glu o Asp; Xaa₁₃ es Trp, Phe, Tyr, o naftilalanina; Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆, Xaa₁₇ son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquiltentilglicina o N-alquilalanina; Xaa₁₈ es Ser, Thr o Tyr; y Z es -OH o -NH₂; a condición de que el compuesto no presente las SEC. ID. N.º 1 ó 2. Los grupos N-alquilo preferidos para la N-alquilglicina, la N-alquiltentilglicina y la N-alquilalanina comprenden preferentemente grupos alquilo de bajo peso molecular con un número de átomos de carbono comprendido entre 1 y aproximadamente 6, más preferentemente entre 1 y 4 átomos de carbono. Los compuestos apropiados comprenden aquellos que presentan las secuencias de aminoácidos SEC. ID N.º 5 a 35.

ES 2 319 936 T3

Los compuestos agonistas de la exendina comprenden aquellos en los que Xaa₁ es His o Tyr. Más preferentemente Xaa₁ es His.

Se prefieren aquellos compuestos en los que Xaa₂ es Gly.

Se prefieren aquellos compuestos en los que Xaa₉ es Leu, pentilglicina, o Met.

Se prefieren aquellos compuestos en los que Xaa₁₃ es Trp o Phe.

Se prefieren asimismo aquellos compuestos en los que Xaa₄ es Phe o naftilalanina; Xaa₁₁ es Ile o Val y Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆ y Xaa₁₇ se seleccionan independientemente de entre Pro, homoprolina, tioprolina o N-alquilalanina. Preferentemente la N-alquilalanina presenta un grupo N-alquilo con un número de átomos de carbono comprendido entre 1 y 6.

Según un aspecto especialmente preferido Xaa₁₅, Xaa₁₆ y Xaa₁₇, son el mismo residuo aminoácido.

Se prefieren los compuestos en los que Xaa₁₈ es Ser o Tyr, más preferentemente Ser.

Preferentemente Z es -NH₂.

Según un aspecto, se prefieren los compuestos de fórmula (I) en los que Xaa₁ es His o Tyr, más preferentemente His; Xaa₂ es Gly; Xaa₄ es Phe o naftilalanina; Xaa₉ es Leu, pentilglicina o Met; Xaa₁₀ es Phe o naftilalanina; Xaa₁₁ es Ile o Val; Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆ y Xaa₁₇ se seleccionan independientemente de entre Pro, homoprolina, tioprolina o N-alquilalanina; y Xaa₁₈ es Ser o Tyr, más preferentemente Ser. Más preferentemente Z es -NH₂.

Según un aspecto particularmente preferido, los compuestos especialmente preferidos comprenden aquellos de fórmula (I) en los que Xaa₁ es His o Arg; Xaa₂ es Gly; Xaa₃ es Asp o Glu; Xaa₄ es Phe o naftilalanina; Xaa₅ es Thr o Ser;

Xaa₆ es Ser o Thr; Xaa₇ es Asp o Glu; Xaa₈ es Leu, o pentilglicina; Xaa₉ es Leu o pentilglicina; Xaa₁₀ es Phe o naftilalanina; Xaa₁₁ es Ile, Val o t-butilglicina; Xaa₁₂ es Glu o Asp; Xaa₁₃ es Trp o Phe;

Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆ y Xaa₁₇ se seleccionan independientemente de entre Pro, homoprolina, tioprolina o N-metilalanina; Xaa₁₈ es Ser o Tyr; y Z es -OH o -NH₂; a condición de que el compuesto no presente la fórmula ninguna de las secuencias SEC. ID. N.º 1 ó 2. Más preferentemente Z es -NH₂. Los compuestos especialmente preferidos comprenden aquellos que presentan las secuencias de aminoácidos SEC. ID. N.º 5, 6, 17, 18, 19, 22, 24, 31, 32 y 35.

Según un aspecto especialmente preferido, se proporcionan los compuestos en los que Xaa₉ es Leu, Ile, Val o pentilglicina; más preferentemente Leu o pentilglicina; y Xaa₁₃ es Phe, Tyr, o naftilalanina, más preferentemente Phe o naftilalanina. Se considera que dichos compuestos presentan una duración de la acción ventajosa y que son menos susceptibles de degradación oxidativa, tanto *in vitro*, como *in vivo*, así como durante la síntesis del compuesto.

Los compuestos a los que se ha hecho referencia anteriormente pueden formar sales con diversos ácidos y bases inorgánicos y orgánicos. Dichas sales comprenden las sales preparadas con ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo, HCl, HBr, H₂SO₄, H₃PO₄, el ácido trifluoacético, el ácido acético, el ácido fórmico, el ácido metanosulfónico, el ácido toluenosulfónico, el ácido maleico, el ácido fumárico, el ácido canforsulfónico. Las sales preparadas con bases comprenden las sales amónicas, las sales de metales alcalinos, por ejemplo, las sales de sodio y potasio, y las sales alcalinotérricas, por ejemplo, las sales de calcio y magnesio. Se prefieren las sales de acetato, hidrocloreto y trifluoacetato. Se pueden formar las sales mediante sistemas convencionales, tales como reaccionando las formas del producto como ácido o base libre con uno o más equivalentes de la base o ácido adecuado en un disolvente o medio en el que la sal es insoluble, o en un disolvente tal como agua que a continuación se elimina al vacío o mediante liofilización o mediante intercambio de iones de una sal existente con otro ion de una resina adecuada de intercambio de iones.

Los compuestos a los que se ha hecho referencia anteriormente pueden formar sales con diversos ácidos y bases inorgánicos y orgánicos. Dichas sales comprenden las sales preparadas con ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo, HCl, HBr, H₂SO₄, H₃PO₄, el ácido trifluoacético, el ácido acético, el ácido fórmico, el ácido metanosulfónico, el ácido toluenosulfónico, el ácido maleico, el ácido fumárico, el ácido canforsulfónico. Las sales preparadas con bases comprenden las sales amónicas, las sales de metales alcalinos, por ejemplo, las sales de sodio y potasio, y las sales alcalinotérricas, por ejemplo, las sales de calcio y magnesio. Se prefieren las sales de acetato, hidrocloreto y trifluoacetato. Se pueden formar las sales mediante sistemas convencionales, tales como reaccionando las formas del producto como ácido o base libre con uno o más equivalentes de la base o ácido adecuado en un disolvente o medio en el que la sal es insoluble, o en un disolvente tal como agua que a continuación se elimina al vacío o mediante liofilización o mediante intercambio de iones de una sal existente con otro ion de una resina adecuada de intercambio de iones.

Los compuestos descritos anteriormente resultan útiles gracias a sus propiedades farmacológicas. En particular, los compuestos de la presente invención presentan actividad como agentes para regular la motilidad gástrica y retardar el vaciado gástrico, tal como se pone de manifiesto mediante la capacidad para inhibir los niveles de vaciado gástrico en los mamíferos.

ES 2 319 936 T3

5 Tal como se describe en el ejemplo 1, se determinó el vaciado gástrico en ratas Sprague Dawley normales utilizando la retención de un gel de metilcelulosa acalórico que contenía rojo de fenol administrado mediante sonda nasogástrica. Se retiró el contenido en colorante tras el sacrificio de los animales 20 minutos más tarde, se determinó mediante espectrometría y se comparó con el de las ratas sacrificadas inmediatamente tras la alimentación mediante sonda nasogástrica para determinar el vaciado. Las exendinas, exendina 3 y exendina 4, inhibieron el vaciado gástrico en función de la dosis. La DE₅₀ (dosis media efectiva) de la respuesta a la exendina 3 y a la exendina 4 fue de 0,1 y 0,08 μg , respectivamente, lo que demuestra que las exendinas resultaron aproximadamente de 170 a 290 veces más potentes que el GLP-1 [7-36] en la inhibición de vaciado gástrico.

10 Tal como se describe en el ejemplo 2, se examinaron los efectos de la exendina-4 y los análogos de la exendina-4, la exendina-4 ácida y la ¹⁴Leu, ²⁵Phe exendina-4, en la inhibición del vaciado gástrico. La exendina-4 y los análogos de la exendina-4 inhibieron el vaciado gástrico en función de la dosis. La DE₅₀ de la exendina-4 fue de 0,27 μg . Las DE₅₀ de la exendina-4 ácida y de la ¹⁴Leu, ²⁵Phe exendina-4 fueron de 0,12 μg y 0,29 μg , respectivamente, lo que indica que la potencia de los análogos era comparable a la de la exendina-4.

15 Tal como se describe en el ejemplo 3, se analizaron los efectos de la exendina-4 y el antagonista del receptor GLP-1 donado, la exendina [9-39] en el vaciado gástrico. Tras 20 minutos, los animales tratados con exendina-4 presentaron una inhibición potente del vaciado gástrico, que no se invirtió mediante la exendina [9-39]. Ello tuvo lugar con independencia de si la exendina [9-39] se administró por vía sc o iv. La exendina [9-39] por sí sola no tuvo efecto alguno en el vaciado gástrico.

20 Tal como se ha indicado anteriormente, la exendina [9-39] constituye un potente antagonista del GLP-1 que se enlaza con el receptor del GLP-1 clonado (Fehmann HC, *et al.*, *Peptides* 15 (3): 453-6, 1994; Thorens B, *et al.*, *Diabetes* 42 (11): 1678-82, 1993). Sorprendentemente, sin embargo, la exendina [9-39] no bloqueó el efecto de la exendina-4 en el vaciado gástrico (véanse las figuras 4 y 5). Dichos resultados indican que los efectos de las exendinas y los agonistas de las exendinas en el vaciado gástrico no se deben al enlace de las exendinas con el receptor GLP-1 clonado, sino que los efectos en el vaciado gástrico de las exendinas y los agonistas de la exendina se deben a su acción en un receptor independiente.

30 Se puede demostrar asimismo que las exendinas pueden actuar mediante mecanismos distintos a los que se pueden atribuir al receptor GLP-1 clonado mediante la ausencia descrita del efecto de la exendina-4 en la inhibición de la secreción de los ácidos gástricos provocada por la pentagastrina, con independencia del efecto inhibidor del GLP-1 en dicha secreción. Gedulin, *et al.*, *Diabetologia*, 40. (Suppl. 1): A300 (Abstract 1181) (1997). Además, tal como se describe en el documento WO 98/30231, titulado *Use of Exendins and Agonists Therefor for the Reduction of Food Intake* ("Utilización de las exendinas y agonistas de las mismas en la reducción de la ingesta alimentaria"), la exendina inyectada periféricamente inhibió la ingesta alimentaria en ratones, una acción que no se observa con el GLP-1.

35 Los compuestos útiles de la invención se pueden presentar convenientemente en la forma de formulaciones aptas para la administración parenteral (comprendiendo la intravenosa, intramuscular y subcutánea) o nasal u oral. En algunos casos, será conveniente suministrar la exendina o el agonista de la exendina y otra sustancia para disminuir el vaciado, tal como el glucagón, o la amilina, o un agonista de la amilina, en una composición o disolución única para su administración conjunta. En otros casos, resultará más ventajoso administrar el agente adicional independientemente de dicha exendina o agonista de la exendina. El formato de administración adecuado se puede determinar de un mejor modo por parte del médico para cada paciente individualmente. Los excipientes 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. Véase 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).

50 Los compuestos útiles en la invención se pueden suministrar como composiciones parenterales para su inyección o venoclisis. Generalmente, se pueden, por ejemplo, suspender en un aceite inerte, siendo adecuado un aceite vegetal tal como el aceite de sésamo, de cacahuete, de oliva o cualquier otro excipiente aceptable. Preferentemente, se suspenden en un excipiente acuoso, por ejemplo, en una disolución amortiguadora isotónica a un pH de aproximadamente 5,6 a 7,4. Dichas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o se pueden filtrar en un medio estéril. Las composiciones contienen sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, entre ellas los agentes amortiguadores del pH. Los amortiguadores útiles comprenden, por ejemplo, las disoluciones amortiguadoras de acetato de sodio/ácido acético. Se puede utilizar una forma de preparación de liberación lenta a modo de depósito o "almacén" de modo 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.

65 La isotonicidad deseada se puede alcanzar empleando cloruro sódico u otros agentes farmacéuticamente aceptables 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 sódico es el preferido particularmente para soluciones amortiguadoras que contienen iones de sodio.

ES 2 319 936 T3

Las composiciones se pueden formular asimismo como sales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, sales de adición de ácidos) y/o complejos de las mismas. Son sales farmacéuticamente aceptables las sales atóxicas a la concentración a la que se administran. La preparación de dichas sales puede facilitar su utilización farmacéutica alterando las características fisicoquímicas de la composición sin impedir que ésta ejerza su efecto fisiológico. Los ejemplos de alteraciones útiles de las propiedades físicas comprenden 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, benzenosulfonato, *p*-toluenosulfonato, ciclohexilsulfamato y las sales de quinina. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden obtener a partir de ácidos como el ácido clorhídrico, 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 benzenosulfónico, el ácido *p*-toluenosulfónico, el ácido ciclohexilsulfámico, y el ácido de quinina. Dichas sales puede 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 intercambio de iones de una sal existente con otro ión o un ión en una resina de intercambio de iones adecuada.

Se pueden utilizar asimismo transportadores o excipientes para facilitar la administración del compuesto. Los ejemplos de transportadores y excipientes comprenden el carbonato cálcico, el fosfato cálcico, diversos glúcidos como la lactosa, la glucosa, o la sacarosa, o tipos de almidón, derivados de la celulosa, gelatina, aceites vegetales, macrogoles y disolventes fisiológicamente compatibles. Las composiciones o la composición farmacéutica puede administrarse por distintas vías comprendiendo la intravenosa, la intraperitoneal, la subcutánea, y la intramuscular, por vía oral, tópica o transmucosa.

Si así se pretende, las disoluciones de las composiciones de las anteriores dosificaciones pueden espesarse mediante un agente espesante tal como la metilcelulosa. Se pueden preparar en forma de emulsión, tanto de agua en aceite como de aceite en agua. Se puede utilizar una amplia variedad de agentes emulsionantes farmacéuticamente aceptables que comprenden, por ejemplo, la goma arábiga, o un agente tensioactivo no iónico (tal como el Tween), o un agente tensioactivo iónico (tal como los sulfatos o sulfonatos de alcohol poliéter alcalino, por ejemplo, Tritón).

Las composiciones útiles de la presente invención se preparan mezclando los ingredientes siguiendo procedimientos aceptados de un modo general. Por ejemplo, los componentes seleccionados se pueden mezclar simplemente en una máquina mezcladora o en cualquier otro dispositivo 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 disolución amortiguadora para controlar el pH o un soluto adicional para controlar la tonicidad.

Para que los pueda utilizar el médico, los compuestos se suministraran en una forma farmacéutica que contiene una cierta cantidad de exendina o de un agonista de la exendina, por ejemplo, exendina-3, exendina-4, con o sin otro agente reductor del vaciado. Las cantidades de exendina o de un agonista de la exendina terapéuticamente efectivas para utilizar en el control del vaciado gástrico y en los trastornos en los que el vaciado gástrico se retarda o regula beneficiosamente son aquellas que disminuyen los niveles pospandriales de glucosa en sangre, preferentemente hasta no más de aproximadamente 8 ó 9 mM o aquellos con los que los niveles de glucosa se reducen tal como se pretende. En pacientes diabéticos o intolerantes a la glucosa, los niveles plásmicos de glucosa han de ser superiores a las de los pacientes normales. En dichos pacientes, se puede alcanzar una reducción beneficiosa o "suavizado" de los niveles pospandriales de glucosa en sangre. Tal como reconocerán los expertos en la materia, la cantidad efectiva de agente terapéutico variará en función de diversos factores, entre ellos la edad y el peso del paciente, la condición física del paciente, el nivel de glucosa o el nivel de reducción del vaciado gástrico a alcanzar, y de otros factores.

Dichas composiciones farmacéuticas resultan útiles provocando la hipomotilidad en un paciente y se pueden utilizar asimismo en otros trastornos en los que se reduce beneficiosamente la motilidad gástrica.

La dosificación diaria eficaz de los compuestos contra el vaciado se encontrará normalmente comprendida entre 0,001 ó 0,003 y aproximadamente 5 mg/día, preferentemente, entre 0,001 ó 0,05 y 2 mg/día, y más preferentemente entre 0,001 ó 0,01 y 1 mg/día, para un paciente de 70 kg. La dosis exacta a administrar la determina el médico adjunto y depende de dónde se encuentra el compuesto en particular dentro de los intervalos indicados anteriormente, así como de la edad, del peso y del estado del paciente. La administración se ha de iniciar cuando aparecen los primeros síntomas o poco después de que se ha diagnosticado, por ejemplo, diabetes mellitus. La administración se puede realizar mediante inyección, preferentemente subcutánea o intramuscular. Los principios activos orales se pueden tomar por vía oral, sin embargo las dosificaciones han de incrementarse de 5 a 10 veces.

Generalmente, al tratar o prevenir los niveles pospandriales elevados, inadecuados o no pretendidos de glucosa en sangre, los compuestos de la presente invención se pueden administrar a pacientes que necesiten dicho tratamiento en unas dosificaciones similares a las proporcionadas anteriormente, sin embargo, los compuestos se administran más frecuentemente, por ejemplo, una, dos o tres veces al día.

ES 2 319 936 T3

La formulación y el modo óptimo de administración de los compuestos de la presente solicitud para un paciente dependen de factores conocidos en la técnica tales como una enfermedad o un trastorno en particular, el efecto que se pretende y el tipo de paciente. Aunque los compuestos habitualmente se emplearán para tratar pacientes humanos, se pueden utilizar también 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 tales como caballos, perros y gatos.

Para ayudar a la comprensión de la presente invención se incorporan los siguientes ejemplos. Los experimentos relacionados con la presente invención, por supuesto, no se han de interpretar como específicamente limitativos de la presente invención y las variaciones de la presente invención, desconocidas o que se desarrollen posteriormente, que pueden encontrarse en el campo de los especialistas en la materia, se considera que caen en el ámbito de la presente invención tal como se describe en el presente documento y tal como se reivindicará posteriormente.

Ejemplo 1

Se realizó el siguiente estudio para examinar los efectos de la exendina-3 y la exendina-4 en el vaciado gástrico y para compara los efectos con el tratamiento con el GLP-1 [7-36] NH₂ en ratas. Dicho experimento se realizó siguiendo una modificación del procedimiento de Scarpignato, *et al.*, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 246: 286-94 (1980).

Se utilizaron ejemplares macho de ratas Harlan Sprague Dawley (HSD). Se alojaron todos los animales a 22,7 ± 0,8°C con un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 (realizándose los experimentos durante el ciclo de luz) y se alimentaron y se les proporcionó agua a discreción (Tekiad: LM 485; Madison, WI). La exendina-3 y la exendina-4 se sintetizaron según los procedimientos estándar de síntesis peptídica.

La determinación del vaciado gástrico mediante el procedimiento que se describirá posteriormente se realizó tras un ayuno de aproximadamente 20 horas para garantizar que el estómago no contuviese producto químico alguno que interfiriera con las determinaciones de absorbancia espectrofotométrica.

Se administró mediante alimentación por sonda nasogástrica a ratas despiertas, 1,5 ml de un gel acalórico que contenía metilcelulosa (M-0262 Sigma Chemical Co, St Louis, MO) al 1,5% y rojo de fenol al 0,05%. Veinte minutos tras la alimentación por sonda nasogástrica, se anestesiaron las ratas utilizando halotano al 5%, se dejó el estómago al descubierto y se sujetó con pinzas arteriales en los esfínteres pilórico y esofágico inferior, se retiró y se abrió en una disolución alcalina que se suministró hasta alcanzar un volumen fijo. Se dedujo el contenido del estómago a partir de la intensidad del rojo de fenol en la disolución alcalina, determinado mediante la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. En experimentos realizados por separado en 7 ratas, se extirparon tanto el estómago como el intestino delgado en una disolución alcalina. La cantidad de rojo de fenol que se pudo recuperar a partir del tracto gastrointestinal superior al cabo de 20 minutos de alimentación por sonda nasogástrica fue del 89 ± 4%; el colorante que se presentó como unido irreversiblemente a la superficie luminal del intestino puede haber influido en el resultado. A fin de representar una recuperación máxima del colorante inferior al 100% del contenido del estómago que permanece tras 20 minutos se expresó como fracción del contenido gástrico recuperado de las ratas de control sacrificadas inmediatamente tras la alimentación por sonda nasogástrica en el mismo experimento. El porcentaje del contenido que permanecía = (absorbancia a los 20 minutos)/(absorbancia 0 mm) x 100.

Se determinó el vaciado gástrico al cabo de 20 minutos mediante unos estudios iniciales, sin tratamiento con fármacos. En los estudios de dosis y respuesta, se trataron las ratas con 0, 0,01, 0,1, 0,3, 1, 5, 10 ó 100 µg de exendina 3, exendina 4, o GLP-1 (7-36) NH₂. Los resultados se presentan en la figura 2. La figura 2 representa cómo las exendinas 3 y 4 inhibieron el vaciado gástrico con aproximadamente la misma DE₅₀ de 0,1 µg, mientras que el GLP-1 (7-36) NH₂ presentó una DE₅₀ de aproximadamente 9 µg, indicando que las exendinas son ~90 veces más potentes que el GLP-1 en la inhibición del vaciado gástrico.

Tal como se representa en la tabla I, se descubrió que la exendina-3 y la exendina-4 eran unos potentes inhibidores del vaciado gástrico. El efecto de la amilina de rata en el vaciado gástrico se proporciona asimismo como segundo control positivo y con propósitos comparativos.

ES 2 319 936 T3

TABLA 1

5	Dosificación μg	Exendina-3		Exendina-4		Amilina de rata			
		% que permanece * (n)	EEM	% que permanece * (n)	EEM	% que permanece * (n)	EEM		
10	Disolución salina de control	48.00 (16)	3.50	46.760 (15)	2.360	46.000(17)	2.000	48.00 (17)	3.5
15	0.010	sin datos		58.240 (3)	3.180	sin datos	2.000	37.60 (2)	2.50
20	0.100	42.00 (7)	6.50	70.770 (3)	5.600	72.000 (3)	12.000	52.70 (6)	6.30
25	0.300	29.60 (7)	3.50	86.420 (3)	6.160	98.000 (2)	4.000	88.20 (4)	3.00
30	1.000	37.20 (9)	2.70	95.330 (3)	0.790	105.000 (1)	0.000	96.80 (9)	2.80
35	3.000	56.60 (10)	6.10					108.00 (4)	2.70
40	10.000	87.90 (11)	2.70	101.760 (3)	3.390	112.000 (3)	2.000	101.10 (6)	3.60
	100.000	103.60 (7)	2.80	103.640 (3)	2.260	103.000 (3)	3.000	101.20 (2)	2.80
* porcentaje de contenido gástrico que permanece al cabo de 20 minutos tras la alimentación por sonda gastrointestinal									

Ejemplo 2

Se examinaron los efectos de los análogos de la exendina-4 en la inhibición del vaciado gástrico y se compararon con los efectos de la exendina-4 según los procedimientos descritos en el ejemplo 1. Se trataron unos ejemplares macho de ratas HSD con 0,01, 0,03, 0,1, 1, 10 y 100 μg de exendina, 0,01, 0,03, 0,1, 1, 10 y 100 μg de exendina-4 ácida, y 0,1, 0,3, 1, 10 y 100 μg de ^{14}Leu , ^{25}Phe exendina-4. Se sintetizaron la exendina-3, la exendina-4 ácida y la ^{14}Leu , ^{25}Phe según los procedimientos estándar de síntesis peptídica. Los resultados, presentados en la figura 3 y en la tabla II, demuestran que los agonistas de la exendina, la exendina-4 ácida y la ^{14}Leu , ^{25}Phe exendina-4, constituyen unos inhibidores potentes del vaciado gástrico. Las CE_{50} de la exendina-4 ácida y la ^{14}Leu , ^{25}Phe exendina-4 resultaron comparables (0,12 μg y 0,29 μg , respectivamente).

TABLA 2

Compuesto	CE_{50} (μg)
exendina-4	0.27
exendina-4 ácida	0.12
^{14}Leu , ^{25}Phe exendina-4	0.29

ES 2 319 936 T3

Ejemplo 3

Se examinó la capacidad de la exendina [9-39], un antagonista de los efectos de la exendina en el receptor del GLP-1 clonado, para antagonizar con el efecto de inhibición del del vaciado gástrico por parte de la exendina-4 y el GLP-1 [7-36] NH₂ según los procedimientos descritos en el ejemplo 1. Las ratas se trataron con 1,0 µg de exendina-4, 1,0 µg de exendina-4 con 0,3 mg de exendina [9-39], 10 µg de GLP-1 [7-36] NH₂, 10 µg de GLP-1 [7-36] NH₂ con 0,3 mg de exendina [9-39] o con 0,3 mg de exendina 9-39 sola. En dichos estudios, la exendina [9-39] se administró tanto por vía subcutánea (sc) como intravenosa (iv). Los resultados de dichos experimentos se representan en las figuras 4 a 7.

Tal como representan las figuras 4 y 5, tras 20 minutos, los animales tratados con exendina-4 presentaron una inhibición muy potente del vaciado gástrico, que no se invirtió mediante la exendina [9-39]. Ello ocurrió independientemente de si la exendina [9-39] se administró por vía sc o iv. La exendina [9-39] sola no tuvo efecto alguno en el vaciado gástrico.

Tal como se ha indicado anteriormente, la exendina [9-39] constituye un potente antagonista del GLP-1 que se fija al receptor del GLP-1 clonado (Fehmann HC, *et al.*, *Peptides* 15 (3): 453-6, 1994; Thorens B, *et al.*, *Diabetes* 42 (11): 1678-82, 1993). Sorprendentemente, sin embargo, la exendina [9-39] no bloquea el efecto de la exendina-4 en el vaciado gástrico (véanse las figuras 4 y 5). Dichos resultados indican que los efectos de las exendinas en el vaciado gástrico no se deben al enlace de las exendinas en el receptor del GLP-1 clonado, sino que en cambio los efectos del vaciado gástrico de las exendinas se deben a un receptor distinto.

El hecho de que la exendina [9-39] no bloquea el efecto del GLP-1 [7-36] NH₂ en el vaciado gástrico (véanse las figuras 6 y 7) indica que, en sus efectos en el vaciado gástrico, el GLP-1 actúa asimismo en un receptor distinto del receptor del GLP-1 donado (en el que la exendina [9-39] constituye un potente antagonista).

Ejemplo 4

Se ensambló el péptido identificado anteriormente en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) utilizando 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). Sin embargo, en algunas posiciones el enlace resultó menos eficiente de lo esperado e hicieron falta dobles enlaces. En particular, los residuos Asp₉, Thr₇ y Phe₆ requirieron doble enlace. La desprotección (eliminación del grupo Fmoc) de la cadena peptídica en crecimiento se consiguió empleando piperidina no resultó siempre eficiente. Se requirió una doble desprotección en las posiciones Arg₂₀, Val₁₉ y Leu₁₄. La desprotección final de la resina peptídica completa se alcanzó utilizando una mezcla de trietilsilano (0,2 ml), etanoditiol (0,2 ml), anisol (0,2 ml), agua (0,2 ml) y ácido trifluoacético (15 ml) siguiendo procedimientos estándar (*Introduction to Cleavage Techniques*, Applied Biosystems, Inc.). El péptido se precipitó en éter y 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 pureza bruta fue del 55% aproximadamente.

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

La disolución 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 14,5 minutos. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4131,7; encontrado 4129,3.

Ejemplo 5

55 Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [6]

El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 25% al 75% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) de péptido liofilizado proporcionó un producto peptídico con un período de retención observado de 21,5 minutos. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4186,6; encontrado 4171,2.

65

ES 2 319 936 T3

Ejemplo 6

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [7]

5 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante
10 unos 30 minutos) de péptido liofilizado proporcionó un producto peptídico con un período de retención observado de 17,9 minutos. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4147,6; encontrado 4150,2.

Ejemplo 7

15 *Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [8]*

El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 35% al 65% de Disolvente B en Disolvente A durante
20 unos 30 minutos) de péptido liofilizado proporcionó un producto peptídico con un período de retención observado de 19,7 minutos. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4212,6; encontrado 4213,2.

25

Ejemplo 8

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [9]

30 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 50% de Disolvente B en Disolvente A durante
35 unos 30 minutos) de péptido liofilizado proporcionó un producto peptídico con un período de retención observado de 16,3 minutos. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4262,7; encontrado 4262,4.

Ejemplo 9

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [10]

45 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del
50 producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4172,6.

Ejemplo 10

55 *Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [11]*

El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del
60 producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4224,7.

65

ES 2 319 936 T3

Ejemplo 11

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [12]

5 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4172,6.

Ejemplo 12

15 *Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [13]*

20 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4186,6.

Ejemplo 13

30 *Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [14]*

35 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4200,7.

Ejemplo 14

40 *Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [15]*

45 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4200,7.

Ejemplo 15

55 *Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [16]*

60 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4202,7.

65

ES 2 319 936 T3

Ejemplo 16

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [17]

5 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4145,6.

Ejemplo 17

15 *Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [18]*

20 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4184,6.

Ejemplo 18

30 *Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [19]*

35 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4145,6.

Ejemplo 19

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [20]

45 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4224,7.

Ejemplo 20

55 *Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [21]*

60 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4172,6.

65

ES 2 319 936 T3

Ejemplo 21

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [22]

5 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil
fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied
Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha
descrito en el Ejemplo 4. En los análisis se utilizaron el Disolvente A (0,1% de TFA en agua) y el Disolvente B
10 (0,1% de TFA en ACN). La analítica mediante RP-HPLC (gradiente del 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente
A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del
producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4115,5.

Ejemplo 22

15 *Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [23]*

El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc dimetoxife-
nil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegi-
dos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo
similar al que se ha descrito en el Ejemplo 4. En los análisis se utilizaron el Disolvente A (0,1% de TFA en agua) y
20 el Disolvente B (0,1% de TFA en ACN). La analítica mediante RP-HPLC (gradiente del 30% al 60% de Disolvente
B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de
retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4188,6.

Ejemplo 23

30 *Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [24]*

El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil
fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied
Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha
descrito en el Ejemplo 1. En los análisis se utilizaron el Disolvente A (0,1% de TFA en agua) y el Disolvente B
35 (0,1% de TFA en ACN). La analítica mediante RP-HPLC (gradiente del 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente
A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del
producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4131,6.

Ejemplo 24

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [25]

45 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil
fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied
Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha
descrito en el Ejemplo 1. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente
A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del
50 producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4172,6.

Ejemplo 25

55 *Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [26]*

El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil
fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied
Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha
descrito en el Ejemplo 1. En los análisis se utilizaron el Disolvente A (0,1% de TFA en agua) y el Disolvente B
60 (0,1% de TFA en ACN). La analítica mediante RP-HPLC (gradiente del 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente
A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del
producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4145,6.

65

ES 2 319 936 T3

Ejemplo 26

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [27]

5 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se requieren dobles enlaces adicionales en las posiciones 38, 37, 36 y 31 de la tioprolina. 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
10 mediante RP-HPLC (gradiente del 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4266,8.

15 Ejemplo 27

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [28]

20 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se requieren dobles enlaces adicionales en las posiciones 38, 37 y 36 de la tioprolina. 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
25 mediante RP-HPLC (gradiente del 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4246,8.

Ejemplo 28

30

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [29]

35 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se requieren dobles enlaces adicionales en las posiciones 38, 37, 36 y 31 de la homoprolina. 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
40 mediante RP-HPLC (gradiente del 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4250,8.

Ejemplo 29

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [30]

45 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se requieren dobles enlaces adicionales en las posiciones 38, 37 y 36 de la homoprolina. 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
50 mediante RP-HPLC (gradiente del 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4234,8.
55

Ejemplo 30

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [31]

60

65 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se requieren dobles enlaces adicionales en las posiciones 38, 37, 36 y 31 de la tioprolina. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4209,8.

ES 2 319 936 T3

Ejemplo 31

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [32]

5 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se requieren dobles enlaces adicionales en las posiciones 38, 37, 36 y 31 de la homoprolina. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4193,7.

15 Ejemplo 32

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [33]

20 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se requieren dobles enlaces adicionales en las posiciones 38, 37, 36 y 31 de la N-metilalanina. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 3858,2.

Ejemplo 33

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [34]

30 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se requieren dobles enlaces adicionales en las posiciones 38, 37 y 36 de la N-metilalanina. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 3940,3.

Ejemplo 34

Preparación del péptido con la SEC. ID. N.º [35]

45 El péptido mencionado anteriormente se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se requieren dobles enlaces adicionales en las posiciones 38, 37, 36 y 31 de la N-metilalanina. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 3801,1.

Ejemplo 35

Preparación de los péptidos con el ácido carboxílico carboxiterminal correspondientes a las secuencias amida carboxiterminales mencionadas anteriormente

60 Los péptidos anteriores se ensamblaron en la denominada resina de Wang (resina de p-alcoxibencilalcohol (Bachem, 0,54 mmoles/g)) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo I. 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 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) del péptido liofilizado se verifica después para determinar el período de retención del producto peptídico. La espectrometría de masas por electroaspersión proporciona una (M) determinada experimentalmente.

ES 2 319 936 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de una exendina o un análogo agonista de la exendina en la realización de un medicamento para utilizar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que puede aprovechar un descenso de la motilidad gastrointestinal o un retardo en el vaciado gástrico en un paciente que necesita los mismos, seleccionándose dicha enfermedad o trastorno de entre la diverticulitis aguda, el síndrome de evacuación gástrica rápida pospandrial, la hiperglucemia pospandrial asociada a una tolerancia disminuida a la glucosa, la hiperglucemia pospandrial asociada a la diabetes mellitus de tipo 1, o la hiperglucemia pospandrial asociada a la diabetes mellitus de tipo 2;

10 provocando dicha exendina o análogo agonista de la exendina la reducción de la motilidad gástrica o el retardo del vaciado gástrico, y

siendo dicha exendina o análogo agonista de la exendina el compuesto peptídico de fórmula:

15

1 5 10

Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Gly Thr Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈

20

15 20

Ser Lys Gln Xaa₉ Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu

25

25 30

Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Leu Lys Asn Gly Gly Xaa₁₄

30

35

Ser Ser Gly Ala Xaa₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Xaa₁₈-Z

en la que

35

Xaa₁ es His, Arg o Tyr;

Xaa₂ es Ser, Gly, Ala o Thr;

40

Xaa₃ es Asp o Glu;

Xaa₄ es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa₅ es Thr o Ser;

45

Xaa₆ es Ser o Thr;

Xaa₇ es Asp o Glu;

50

Xaa₈ es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met;

Xaa₉ es Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met;

Xaa₁₀ es Phe, Tyr o naftilalanina;

55

Xaa₁₁ es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met;

Xaa₁₂ es Glu o Asp;

60

Xaa₁₃ es Trp, Phe, Tyr, o naftilalanina;

Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆, Xaa₁₇ son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquilpentilglicina o N-alquilalanina; Xaa₁₈ es Ser, Thr o Tyr; y

65

Z es -OH o -NH₂,

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

ES 2 319 936 T3

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad o trastorno es una diverticulitis aguda.

3. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad o trastorno es el síndrome de evacuación gástrica rápida pospandrial

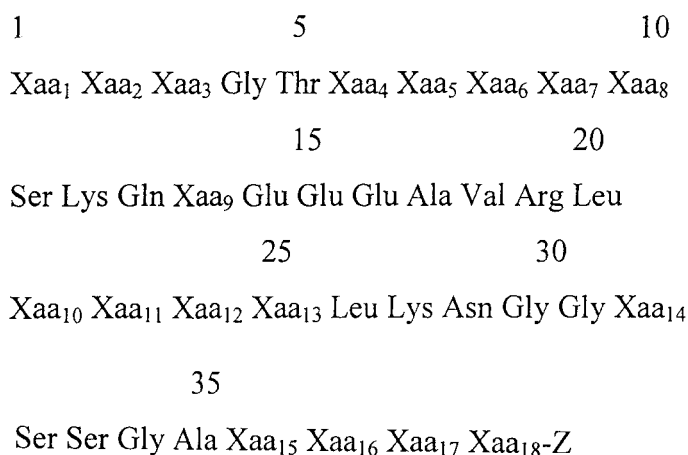
5 4. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad o trastorno es una hiperglucemia pospandrial asociada a la diabetes mellitus de tipo 1.

10 5. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad o trastorno es una hiperglucemia pospandrial asociada a la diabetes mellitus de tipo 2.

6. Utilización según la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad o trastorno es una hiperglucemia pospandrial asociada a una tolerancia disminuida a la glucosa.

15 7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que el medicamento comprende una cantidad de exendina o análogo agonista de la exendina tal que al administrar una dosis de exendina o análogo agonista de la exendina disminuye los niveles pospandriales de glucosa hasta no más de 9 mM.

20 8. Utilización de una exendina o un análogo agonista de la exendina en un procedimiento de diagnóstico gastrointestinal, proporcionando dicha exendina o análogo agonista de la exendina una regulación beneficiosa de la motilidad gastrointestinal, siendo dicha exendina o análogo agonista de la exendina el compuesto peptídico de fórmula:



en la que

Xaa₁ es His, Arg o Tyr;

45 Xaa₂ es Ser, Gly, Ala o Thr;

Xaa₃ es Asp o Glu;

50 Xaa₄ es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa₅ es Thr o Ser;

Xaa₆ es Ser o Thr;

55 Xaa₇ es Asp o Glu;

Xaa₈ es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met;

60 Xaa₉ es Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met;

Xaa₁₀ es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa₁₁ es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met;

65 Xaa₁₂ es Glu o Asp;

Xaa₁₃ es Trp, Phe, Tyr, o naftilalanina;

ES 2 319 936 T3

Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆, Xaa₁₇ son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquilpentilglicina o N-alquilalanina;

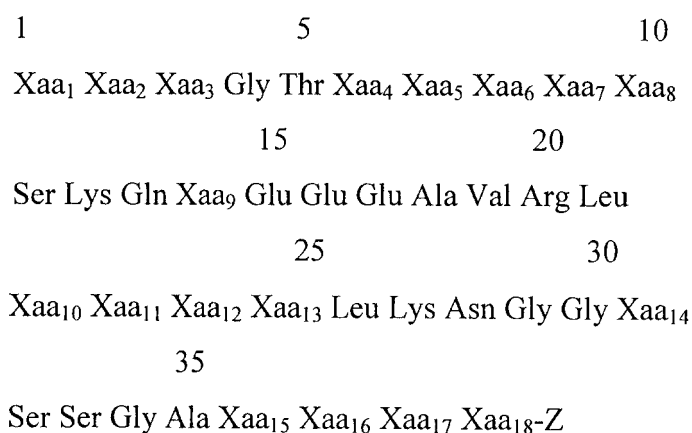
Xaa₁₈ es Ser, Thr o Tyr; y

Z es -OH o -NH₂,

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

9. Utilización según la reivindicación 8, en el que dicho procedimiento de diagnóstico gastrointestinal es un examen radiológico o una imagen por resonancia magnética nuclear.

10. Utilización de una exendina o un análogo agonista de la exendina en la realización de un medicamento para utilizar en el tratamiento ante la ingestión de una toxina, proporcionando dicha exendina o análogo agonista de la exendina una regulación beneficiosa de la motilidad gastrointestinal, siendo dicha exendina o análogo agonista de la exendina el compuesto peptídico de fórmula:



en la que

Xaa₁ es His, Arg o Tyr;

Xaa₂ es Ser, Gly, Ala o Thr;

Xaa₃ es Asp o Glu;

Xaa₄ es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa₅ es Thr o Ser;

Xaa₆ es Ser o Thr;

Xaa₇ es Asp o Glu;

Xaa₈ es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met;

Xaa₉ es Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met;

Xaa₁₀ es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa₁₁ es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met;

Xaa₁₂ es Glu o Asp;

Xaa₁₃ es Trp, Phe, Tyr, o naftilalanina;

Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆, Xaa₁₇ son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquilpentilglicina o N-alquilalanina;

Xaa₁₈ es Ser, Thr o Tyr; y

ES 2 319 936 T3

Z es -OH o -NH₂,

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la exendina o análogo agonista de la exendina se administra en una dosificación de 0,001 mg/70 kg y 1 mg/70 kg por día en dosis unitarias o fraccionadas.

12. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la exendina o análogo agonista de la exendina se administra en una dosificación de 0,001 mg/70 kg y 1 mg/70 kg una, dos o tres veces por día.

13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, en la que la exendina o análogo agonista de la exendina se administra en una dosificación comprendida entre 0,001 mg/70 kg y 0,05 mg/70 kg.

14. Utilización según la reivindicación 13, en la que la exendina o análogo agonista de la exendina se administra en una dosificación comprendida entre 0,001 mg/70 kg y 0,01 mg/70 kg.

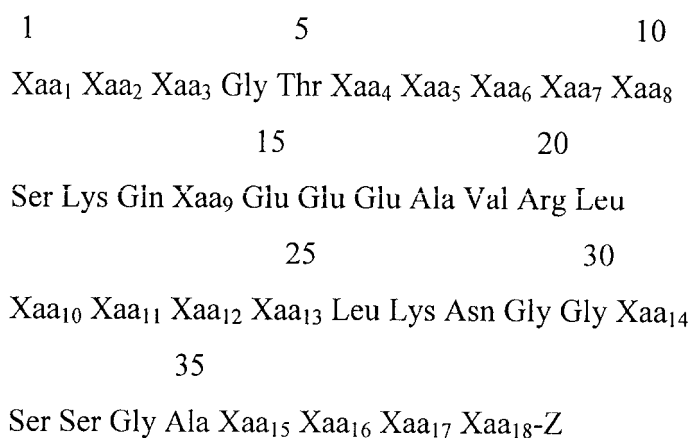
15. Utilización según cualquier de las reivindicaciones anteriores, en la que la exendina o análogo agonista de la exendina se administra como una composición farmacéutica que comprende una disolución amortiguadora isotónica a un pH de aproximadamente 5,6 a 7,4.

16. Utilización según cualquier de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la exendina o análogo agonista de la exendina se administra como una composición farmacéutica que comprende una disolución amortiguadora de acetato de sodio/ácido acético.

17. Utilización según cualquier de las reivindicaciones anteriores, en la que la dicha exendina es la exendina 4.

18. Utilización según cualquier de las reivindicaciones 1 a 16, en la que la dicha exendina es la exendina 3.

19. Utilización según cualquier de las reivindicaciones 1 a 16, en la que dicho análogo agonista de la exendina es un compuesto peptídico de fórmula:



en la que

Xaa₁ es His o Arg;

Xaa₂ es Ser o Gly;

Xaa₃ es Asp o Glu;

Xaa₄ es Phe o naftilalanina;

Xaa₅ es Thr o Ser;

Xaa₆ es Ser o Thr;

Xaa₇ es Asp o Glu;

Xaa₈ es Leu o pentilglicina;

Xaa₉ es Leu o pentilglicina;

ES 2 319 936 T3

Xaa₁₀ es Phe o naftilalanina;

Xaa₁₁ es Ile, Val o terc-butilglicina;

5 Xaa₁₂ es Glu o Asp;

Xaa₁₃ es Trp, Phe;

10 Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆, Xaa₁₇ son independientemente Pro, homoprolina, tioprolina o N-alquilalanina;

Xaa₁₈ es Ser o Tyr; y

Z es -OH o -NH₂,

15 a condición de que el compuesto no presente la fórmula de la exendina-3 [SEC. ID. N.º 1] o de exendina-4 [SEC. ID. N.º 2] o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

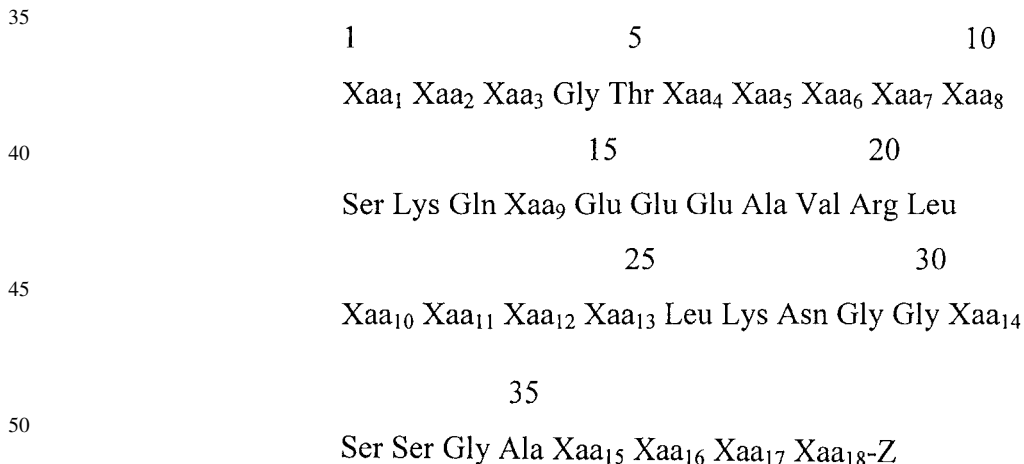
20. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una cantidad efectiva de una amilina o de un análogo agonista de la amilina.

21. Utilización según la reivindicación 20, en la que dicho análogo agonista de la amilina es la ²⁵Pro, ²⁸Pro, ²⁹Pro-g-amilina.

22. Exendina o análogo agonista de la exendina para utilizar en el tratamiento de una enfermedad o trastorno que puede aprovechar un descenso de la motilidad gastrointestinal o un retardo en el vaciado gástrico, seleccionándose dicha enfermedad o trastorno de entre la diverticulitis aguda, el síndrome de evacuación gástrica rápida pospandrial, la hiperglucemia pospandrial asociada a una tolerancia disminuida a la glucosa, la hiperglucemia pospandrial asociada a la diabetes mellitus de tipo 1, o la hiperglucemia pospandrial asociada a la diabetes mellitus de tipo 2;

30 provocando dicha exendina o análogo agonista de la exendina la reducción de la motilidad gástrica o el retardo del vaciado gástrico,

siendo dicha exendina o análogo agonista de la exendina el compuesto peptídico de fórmula:



en la que

55 Xaa₁ es His, Arg o Tyr;

Xaa₂ es Ser, Gly, Ala o Thr;

60 Xaa₃ es Asp o Glu;

Xaa₄ es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa₅ es Thr o Ser;

65 Xaa₆ es Ser o Thr;

Xaa₇ es Asp o Glu;

ES 2 319 936 T3

Xaa₈ es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met;

Xaa₉ es Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met;

5 Xaa₁₀ es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa₁₁ es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met;

Xaa₁₂ es Glu o Asp;

10 Xaa₁₃ es Trp, Phe, Tyr, o naftilalanina;

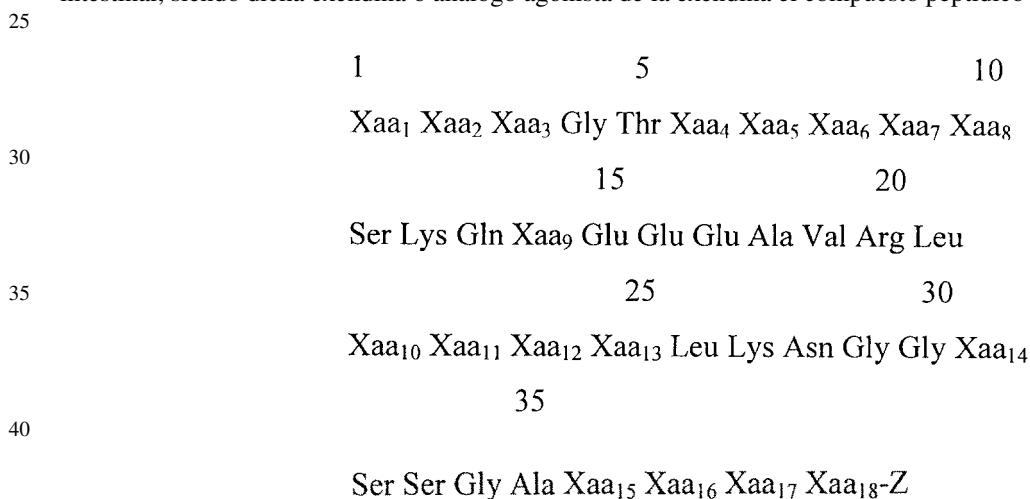
Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆, Xaa₁₇ son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquilpentilglicina o N-alquilalanina;

15 Xaa₁₈ es Ser, Thr, o Tyr; y

Z es -OH o -NH₂,

20 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

23. Exendina o análogo agonista de la exendina para utilizar en el tratamiento ante la ingestión de una toxina, proporcionando dicha exendina o análogo agonista de la exendina una regulación beneficiosa de la motilidad gastrointestinal, siendo dicha exendina o análogo agonista de la exendina el compuesto peptídico de fórmula:



45 en la que

Xaa₁ es His, Arg o Tyr;

50 Xaa₂ es Ser, Gly, Ala o Thr;

Xaa₃ es Asp o Glu;

55 Xaa₄ es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa₅ es Thr o Ser;

Xaa₆ es Ser o Thr;

60 Xaa₇ es Asp o Glu;

Xaa₈ es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met;

Xaa₉ es Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met;

65 Xaa₁₀ es Phe, Tyr o naftilalanina;

ES 2 319 936 T3

Xaa₁₁ es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met;

Xaa₁₂ es Glu o Asp;

5 Xaa₁₃ es Trp, Phe, Tyr, o naftilalanina;

Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆, Xaa₁₇ son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquilpentilglicina o N-alquilalanina;

10 Xaa₁₈ es Ser, Thr o Tyr; y

Z es -CH o -NH₂,

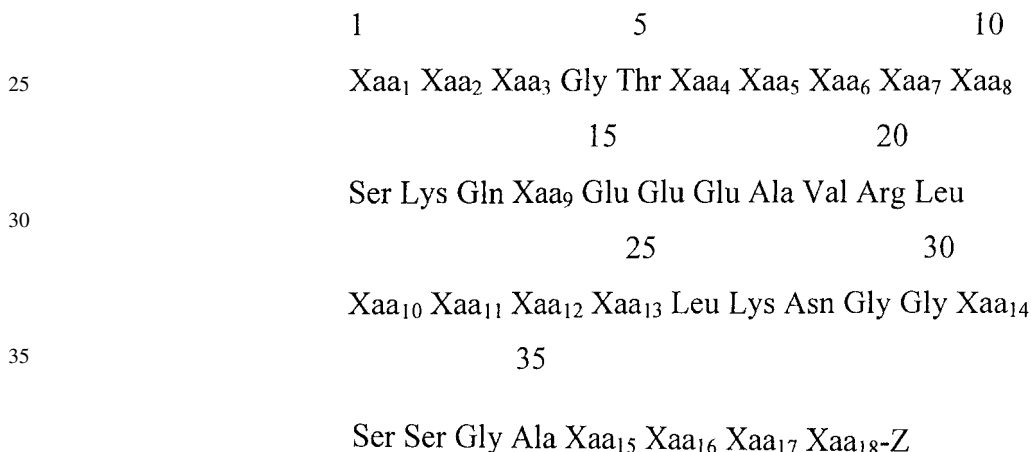
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

15

24. Exendina o análogo agonista de la exendina según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23, en la que la exendina es la exendina 3 o la exendina 4.

20

25. Exendina o análogo agonista de la exendina según cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23, en la que dicho análogo agonista de la exendina es un compuesto peptídico de fórmula:



en la que

Xaa₁ es His o Arg;

45

Xaa₂ es Ser o Gly;

Xaa₃ es Asp o Glu;

50

Xaa₄ es Phe o naftilalanina;

Xaa₅ es Thr o Ser;

Xaa₆ es Ser o Thr;

55

Xaa₇ es Asp o Glu;

Xaa₈ es Leu o pentilglicina;

60

Xaa₉ es Leu o pentilglicina;

Xaa₁₀ es Phe o naftilalanina;

Xaa₁₁ es Ile, Val o terc-butilglicina;

65

Xaa₁₂ es Glu o Asp;

Xaa₁₃ es Trp o Phe;

ES 2 319 936 T3

Xaa₁₄, Xaa₁₅, Xaa₁₆, Xaa₁₇ son independientemente Pro, homoprolina, tioprolina o N-alquilalanina;

Xaa₁₈ es Ser o Tyr; y

5 Z es -OH o -NH₂,

a condición de que el compuesto no presente la fórmula de la exendina-3 [SEC. ID. N.º 1] o de exendina-4 [SEC. ID. N.º 2] o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

GPL-1 (7-37)
HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFWLWKGR G-NH₂

EXENDINA-3
HSDGFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNNG PSSGAPPS-NH₂

EXENDINA-4
HCEGFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNNG PSSGAPPS-NH₂

EXENDINA-[9-39]
DL SKQMEEEAVR LFIEWLKNNG PSSGAPPS-NH₂

FIG. 1

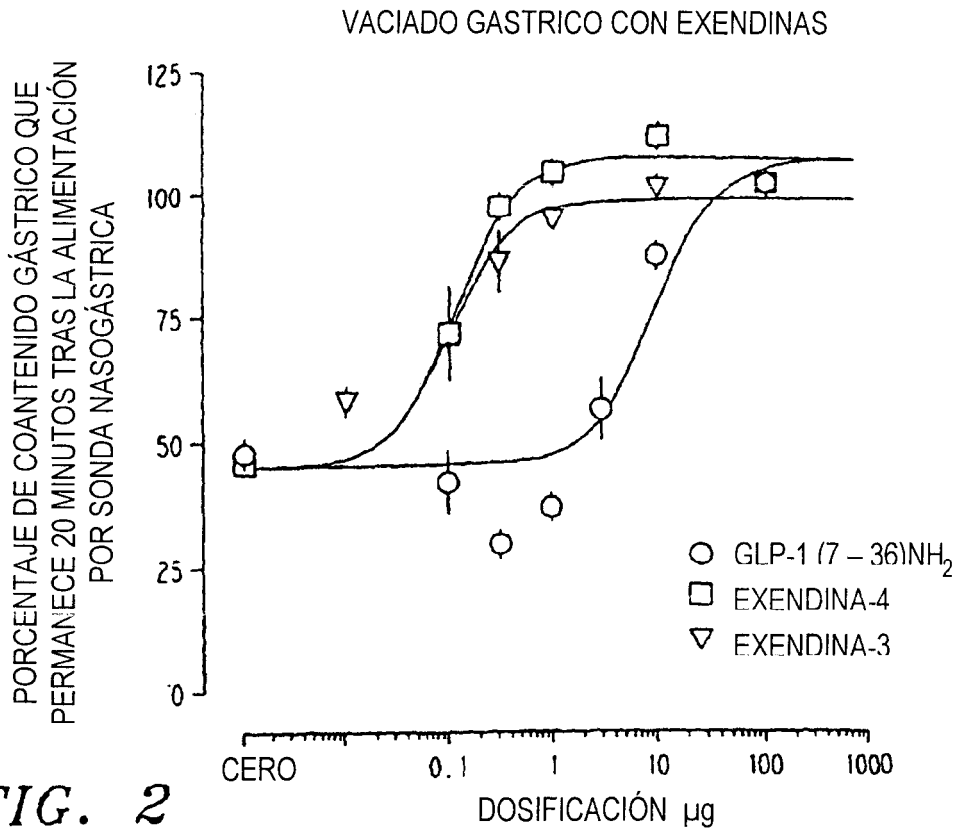


FIG. 2

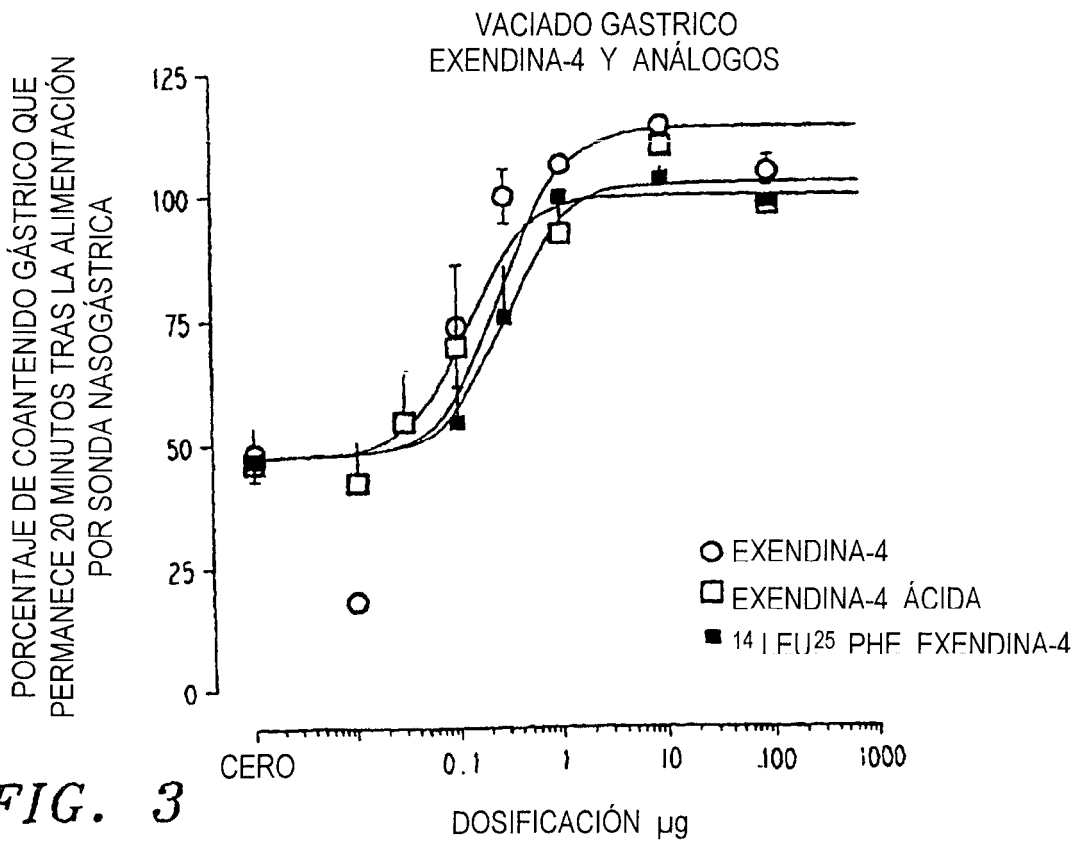
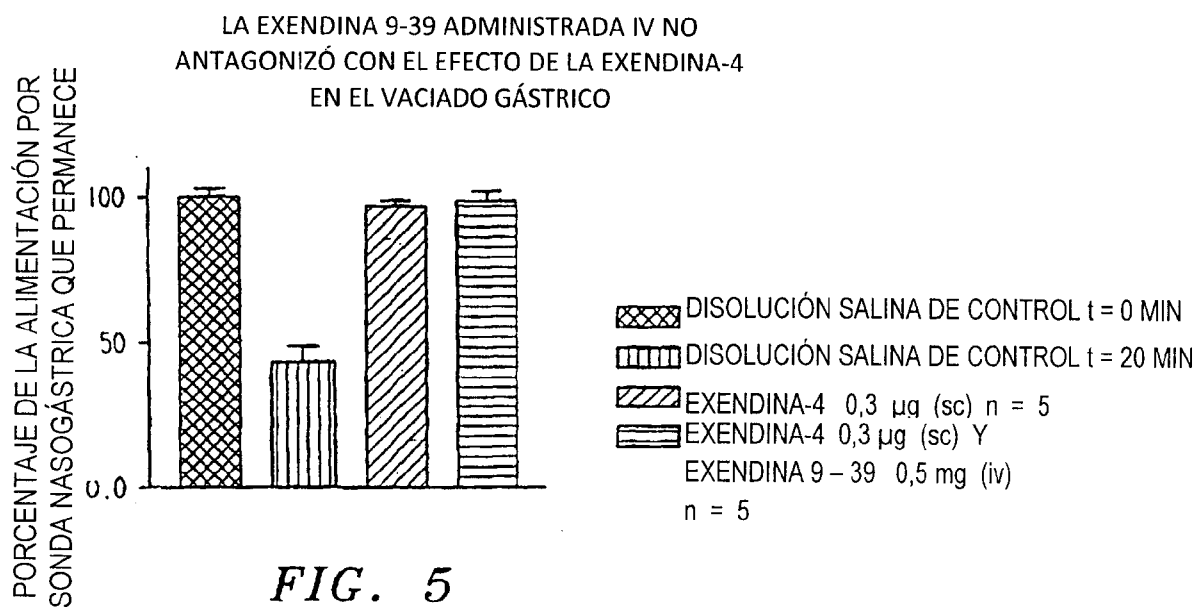
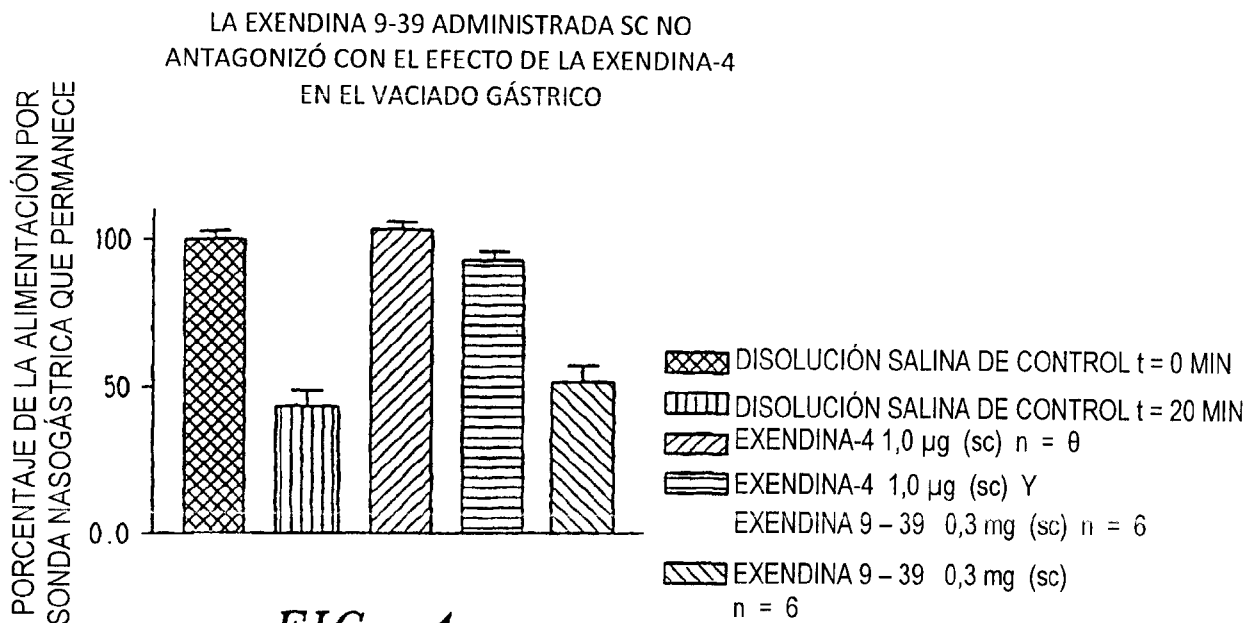


FIG. 3



LA EXENDINA 9-39 ADMINISTRADA SC NO ANTAGONIZÓ CON EL EFECTO DEL GLP-1 EN EL VACIADO GÁSTRICO

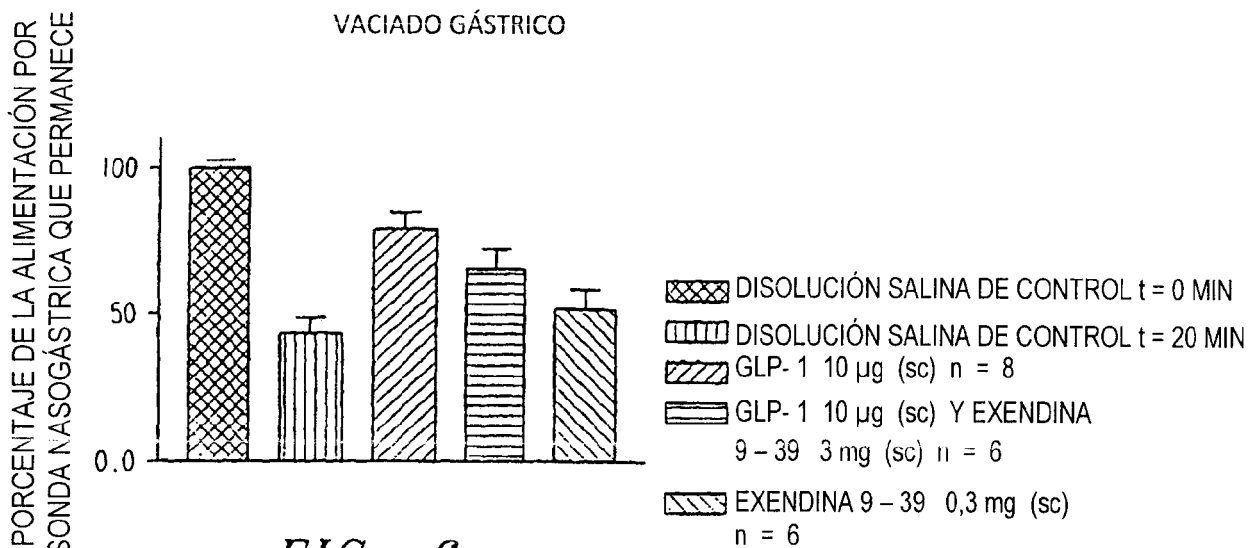


FIG. 6

LA EXENDINA 9-39 ADMINISTRADA IV NO ANTAGONIZÓ CON EL EFECTO DEL GLP-1 EN EL VACIADO GÁSTRICO

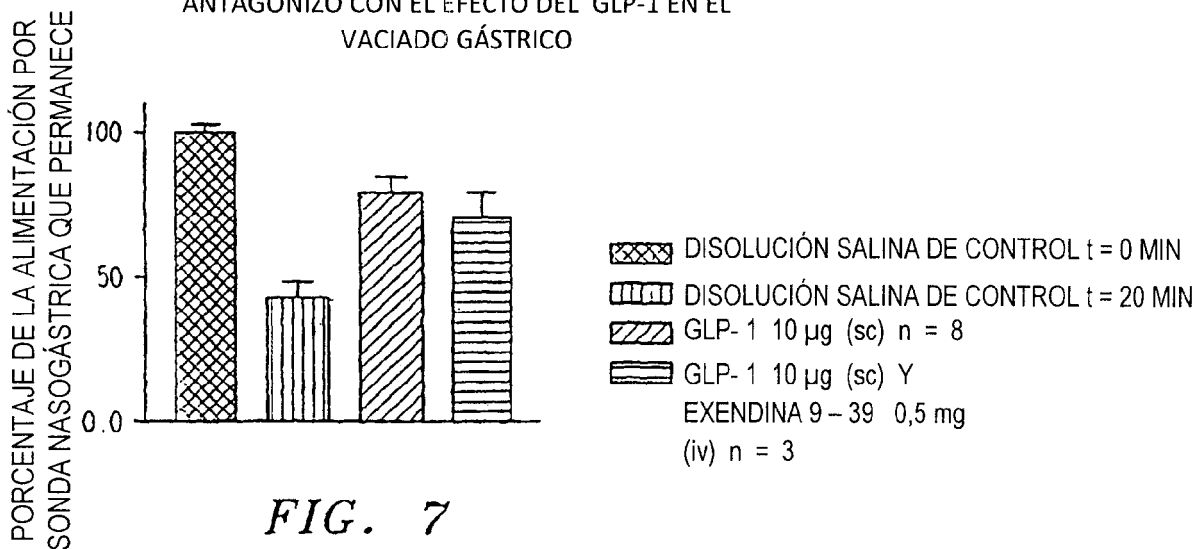


FIG. 7

1 Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Gly Thr Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Ser Lys Gln Xaa₉ Glu Glu Ala Val Arg Leu 20
 5 Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Leu Lys Asn Gly Gly Xaa₁₄ Ser Ser Gly Ala Xaa₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Xaa₁₈ -Z
 10 15 20
 25 30 35

COMPUESTO [SEC. ID N°]	Xaa ₁	Xaa ₂	Xaa ₃	Xaa ₄	Xaa ₅	Xaa ₆	Xaa ₇	Xaa ₈	Xaa ₉	Xaa ₁₀	Xaa ₁₁	Xaa ₁₂	Xaa ₁₃	Xaa ₁₄	Xaa ₁₅	Xaa ₁₆	Xaa ₁₇	Xaa ₁₈	Z
1 [5]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
2 [6]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
3 [7]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
4 [8]	Tyr	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
5 [9]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Tyr	NH ₂
6 [10]	His	Gly	Asp	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Asp	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
7 [11]	His	Gly	Glu	naph	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	naph	Ile	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
8 [12]	His	Gly	Glu	Phe	Ser	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
9 [13]	His	Gly	Glu	Phe	Ser	Thr	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
10 [14]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Thr	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
11 [15]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Glu	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
12 [16]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	pGly	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
13 [17]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	pGly	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
14 [18]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	pGly	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂

FIG. 8A

COMPUESTO [SEC. ID Nº]	X001	X002	X003	X004	X005	X006	X007	X008	X009	X0010	X0011	X0012	X0013	X0014	X0015	X0016	X0017	X0018	Z
15 [19]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	pGly	Phe	Ile	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
16 [20]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	noph	Ile	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
17 [21]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Val	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
18 [22]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Val	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
19 [23]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	tBug	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Tyr	NH ₂
20 [24]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	tBug	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
21 [25]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	noph	Ile	Asp	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
22 [26]	His	Ala	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH ₂
23 [27]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	hPro	hPro	hPro	hPro	Ser	NH ₂
24 [28]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	hPro	hPro	hPro	Ser	NH ₂
25 [29]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	hPro	hPro	hPro	hPro	Ser	NH ₂
26 [30]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	hPro	hPro	hPro	Ser	NH ₂
27 [31]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	hPro	hPro	hPro	hPro	Ser	NH ₂
28 [32]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	hPro	hPro	hPro	hPro	Ser	NH ₂
29 [33]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	MeAla	MeAla	MeAla	MeAla	Ser	NH ₂
30 [34]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	MeAla	MeAla	MeAla	Ser	NH ₂
31 [35]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	MeAla	MeAla	MeAla	MeAla	Ser	NH ₂

FIG. 8B