(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 359 031**

(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: **08016667 .1**
(96) Fecha de presentación : **08.08.1997**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2016950**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2009**

(54) Título: **Composición farmacéutica que comprende un péptido de exendina-4.**

(30) Prioridad: **08.08.1996 US 694954**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **17.05.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **17.05.2011**

(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 2 359 031 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).

DESCRIPCION

Composición farmacéutica que comprende un péptido de exendina-4.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido de exendina-4.

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] NH_2 (Goke, *et al*., *J. Biol. Chem*., 268: 19650 - 55, 1993). El GLP-1 [7 – 36] NH_2 [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] NH_2 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 insulinotrópico, estimulando la secreción de insulina de las células ß 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 insulinotrópico del GLP-1 a partir de una estirpe de células ß (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 ßTC1, 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 insulinotrópicas 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).

Los agentes que sirven para retardar el vaciado gástrico han encontrado su lugar en la medicina como herramienta de diagnóstico en las exploraciones radiológicas gastrointestinales. Por ejemplo, el glucagón es una hormona polipeptídica que se produce en las células α de los islotes pancreáticos de Langerhans. Es un agente hiperglucémico que moviliza la glucosa activando la gluconeogénesis hepática. En un menor grado puede estimular la secreción de la insulina pancreática. El glucagón se utiliza en el tratamiento de la hipoglucemia provocada por la insulina cuando no 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 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).

Los métodos para regular la motilidad gastrointestinal empleando agonistas de la amilina se describen en el documento WO 98/07098, publicado el 16 de marzo de 1995.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido de exendina-4 que presenta la secuencia de aminoácidos HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS en una cantidad comprendida entre 0,001 mg y 1 mg basándose en un paciente de 70 kg; una disolución amortiguadora farmacéuticamente aceptable; un agente de isotonicidad farmacéuticamente aceptable; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización la disolución amortiguadora es una disolución amortiguadora de acetato.

En una forma de realización adicional, el agente de isotonicidad es cloruro sódico, dextrosa, ácido bórico, tartrato sódico, propilenglicol o un poliol. Más específicamente, el agente de isotonicidad puede ser un poliol tal como el manitol o el sorbitol.

En otra forma de realización, el excipiente farmacéuticamente aceptable es carbonato cálcico, fosfato cálcico, lactosa, glucosa, sacarosa, almidón, un derivado de la celulosa, una gelatina, un aceite vegetal, macrogol o un disolvente fisiológicamente compatible.

En otra forma de realización, la composición comprende el péptido de exendina-4 en una cantidad comprendida entre 0,01 mg y 1 mg basándose en un paciente de 70 kg.

La composición farmacéutica se puede formular para proporcionar una dosis diaria unitaria o fraccionaria del péptido de exendina-4.

La composición farmacéutica se puede formular para su administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, oral, tópica o transmucosa. En una forma de realización específica, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica inyectable por vía subcutánea.

En la composición farmacéutica de la presente invención, el péptido de exendina-4 puede comprender un ácido de exendina-4 o una amida de exendina-4.

Definiciones

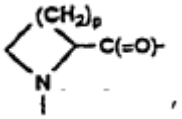
Según la presente invención y tal como se emplean en el presente documento, los siguientes términos se definen con los siguientes significados excepto cuando se establezca de otro modo.

El término «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 ß-alanina, el ácido aminopropiónico, el ácido 2-aminobutírico, el ácido 4-aminobutírico, el ácido 6-aminocaproico, el ácido 2-aminoheptanoico, el ácido 2-aminoisobutírico, el ácido 3-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-hidroxiprolina, la 4-hidroxiprolina, la isodesmosina, 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 pipecólico y la tioprolina. 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 – (ß-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 pipecólico.

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 "CH_3CN" 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 fluorenilmetoxicarbonilo.
"HBTU" se refiere al hexaflurofosfato 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] NH_2, 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 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.

LA FIGURA 3 representa los efectos dosis - respuesta de la inyección previa de exendina-4 (n = 29), exendina-4 ácida (n = 36) y ^{14}Leu, ^{25}Phe 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.

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.

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.

LA FIGURA 6 representa el efecto de la inyección previa de 10 µg de GLP-1 [7 - 36] NH_2 (sc), n = 8; 10 µg GLP-1 [7 - 36] NH_2 (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] NH_2 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] NH_2, la exendina [9 - 39] no antagonizó con el efecto del GLP-1 [7 - 36] NH_2 en la inhibición del vaciado gástrico.

LA FIGURA 7 representa el efecto de la inyección previa de 10 µg de GLP-1 [7 - 36] NH_2 (sc), n = 8 y 10 µg GLP-1 [7 - 36] NH_2 (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] NH_2 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] NH_2, la exendina [9 - 39] (iv) no antagonizó con el efecto del GLP-1 [7 - 36] NH_2 en la inhibición del vaciado gástrico.

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 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 adenilciclasa 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.

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.

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-carbamoílo 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 diciclohexilcarobodiimida y el 1-hidrozibenzotriazol en presencia de una base tal como la diisopropiletilamina. El grupo protector α-N-carbamoílo 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-butiloxicarbonill (tBoc) y el fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).

Los disolventes, los derivados de aminoácidos y la resina de 4-metilbenzhidril-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 ºC a 0 ºC, 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 / CH_3CN) 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 ºC, 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 Laboratorv Manual* («Clonación molecular: manual de laboratorio»), 2ª Ed., Cold Spring Harbor (1989). Alternativamente, dichos compuestos se pueden prepara mediante procedimientos de síntesis de péptidos en fase homogénea.

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, H_2SO_4, H_3PO_4, él 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 alcalinotérreas, por ejemplo, las sales de calcio y magnesio. Se prefieren las sales de acetato, hidrocloruro 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.

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 DE_{50} (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.

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 ^{14}Leu, ^{25}Phe exendina-4, en la inhibición del vaciado gástrico. La exendinas-4 y los análogos de la exendina-4 inhibieron el vaciado gástrico en función de la dosis. La DE_{50} de la exendina-4 fue de 0,27 µg. Las DE_{50} de la exendina-4 ácida y de la ^{14}Leu, ^{25}Phe 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.

Tal como se describe en el ejemplo 3, se analizaron los efectos de la exendina-4 y el antagonista del receptor GLP-1 clonado, 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.

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.

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»), presentada el 7 de enero de 1977, la exendina inyectada periféricamente inhibió la ingesta alimentaria en ratones, una acción que no se observa con el GLP-1.

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).

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.

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.

Las composiciones reivindicadas 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, hidrocloruro, fosfato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *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 bencenosulfónico, 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 el 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 plasmáticos 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 administra más frecuentemente, por ejemplo, una, dos o tres veces al día.

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.

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] NH_2 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 ºC 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 (Teklad: 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)NH_2. 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 DE_{50} de 0,1 µg, mientras que el GLP-1(7-36)NH_2 presentó una DE_{50} 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.

TABLA I

Dosifica-ción µg	GLP-1(7-36)NH,		Exendina-3		Exendina-4		Amilina de rata	
	% que permanece *(n)	SEM	% que permanece *(n)	SEM	% que permanece *(n)	SEM	% que permanece *(n)	SEM
Control Salina	45.00 (16)	3.50	46.760 (15)	2.360	46.000(17)	2.000	48.00 (17)	3.5
0.010	sin datos		55.240 (3)	3.180	sin datos	2.000	37.60 (2)	2.50
0.100	42.00 (7)	6.50	70.770 (3)	5.600	72.000 (3)	12.000	52.70 (6)	6.30
0.300	29.60 (7)	3.50	86.420 (3)	6.160	98.000 (2)	4.000	88.20 (4)	3.00
1.000	37.20 (9)	2.70	95.330 (3)	0.790	105.000 (1)	0.000	96.80 (9)	2.80
3.000	56.60 (10)	6.10					108.00 (4)	2.70
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

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 II

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

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 vaciado gástrico por parte de la exendina-4 y el GLP-1 [7 - 36] NH_2 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] NH_2, 10 µg de GLP-1 [7 - 36] NH_2 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] NH_2 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 clonado (en el que la exendina [9 - 39] constituye un potente antagonista).

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende un péptido de exendina-4 que presenta la secuencia de aminoácidos HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS en una cantidad comprendida entre 0,001 mg y 1 mg apta para un paciente de 70 kg; una disolución amortiguadora farmacéuticamente aceptable; un agente de isotonicidad farmacéuticamente aceptable; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que la disolución amortiguadora es una disolución amortiguadora de acetato.

3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el agente de isotonicidad es cloruro sódico, dextrosa, ácido bórico, tartrato sódico, propilenglicol o un poliol.

4. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en la que el agente de isotonicidad es un poliol

5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en la que el agente de isotonicidad es manitol o sorbitol.

6. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el excipiente farmacéuticamente aceptable es carbonato cálcico, fosfato cálcico, lactosa, glucosa, sacarosa, almidón, un derivado de la celulosa, una gelatina, un aceite vegetal, macrogol o un disolvente fisiológicamente compatible.

7. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende el péptido de exendina-4 en una cantidad comprendida entre 0,01 mg y 1 mg basándose en un paciente de 70 kg.

8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que a composición farmacéutica se puede formular para proporcionar una dosis diaria unitaria o fraccionaria del péptido de exendina-4.

9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición farmacéutica se puede formular para su administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, oral, tópica o transmucosa.

10. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición farmacéutica es una composición farmacéutica inyectable por vía subcutánea.

11. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el péptido de exendina-4 puede comprender un ácido de exendina-4 o una amida de exendina-4.

Figura 1

GLP-1 (7-37)

HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFIAWLVKGR G-NH_2

Exendina-3

HSDGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH_2

Exendina-4

HGEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH_2

Exendina-[9-39]

DL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH_2

FIGURA 2

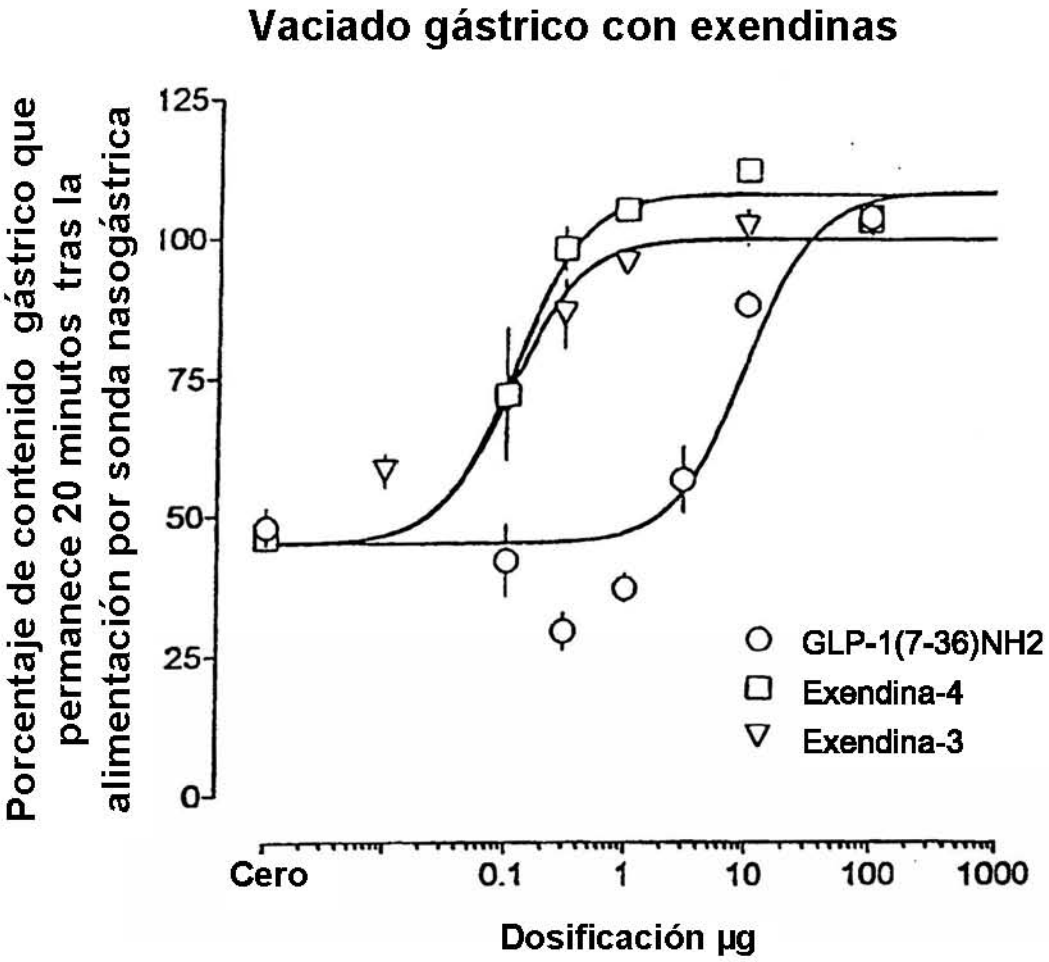

Vaciado gástrico con exendinas
Porcentaje de contenido gástrico que permanece 20 minutos tras la alimentación por sonda nasogástrica
125
100
75
50
25
0
GLP-1(7-36)NH2
Exendina-4
Exendina-3
Cero
0.1
1
10
100
1000
Dosificación µg

Figura 3

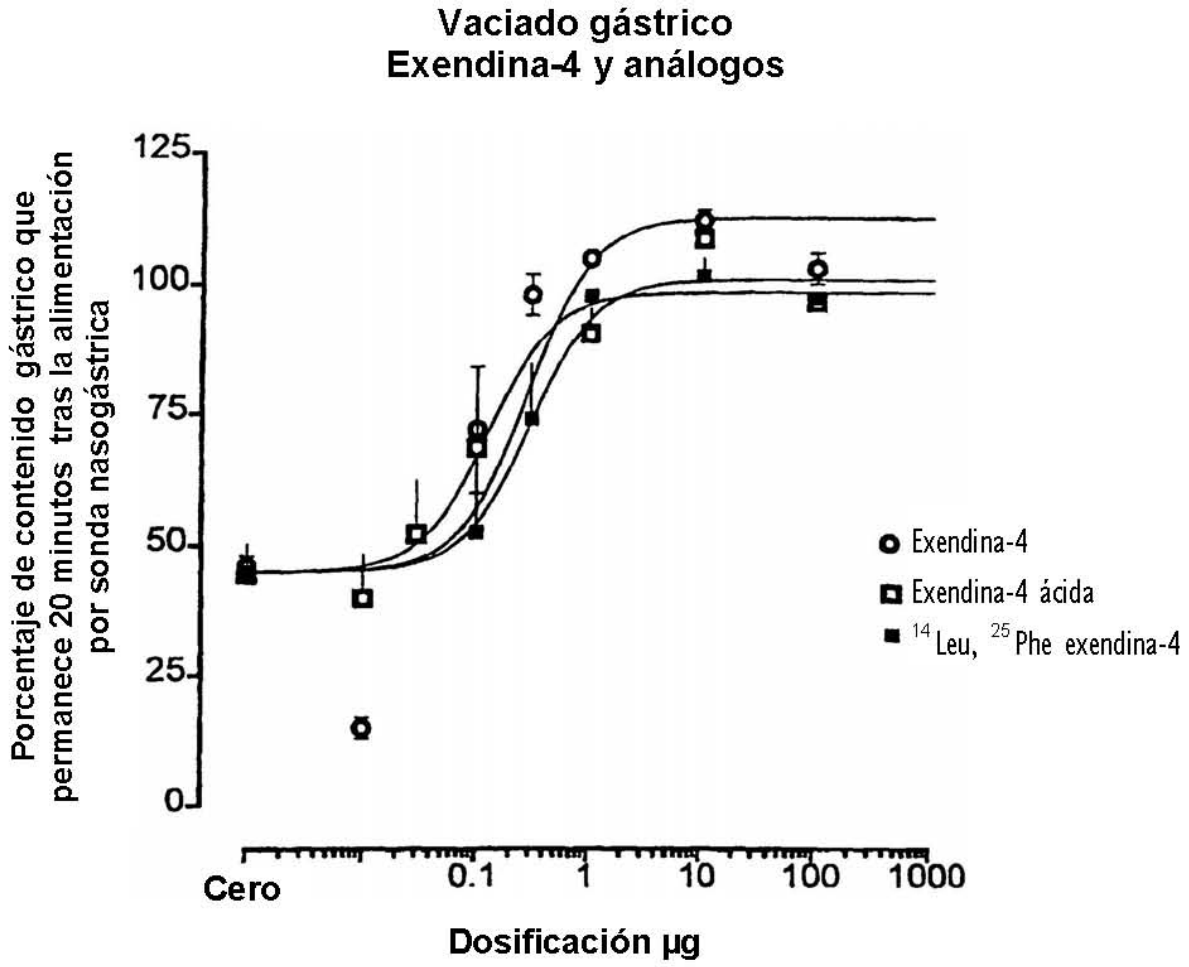

Vaciado gástrico
Exendina-4 y análogos
Porcentaje de contenido gástrico que permanece 20 minutos tras la alimentación por sonda nasogástrica
125
100
75
50
25
0
Cero
0.1
1
10
100
1000
Dosificación µg
Exendina-4
Exendina-4 ácida
14 Leu, 25 Phe exendina-4

Figura 4

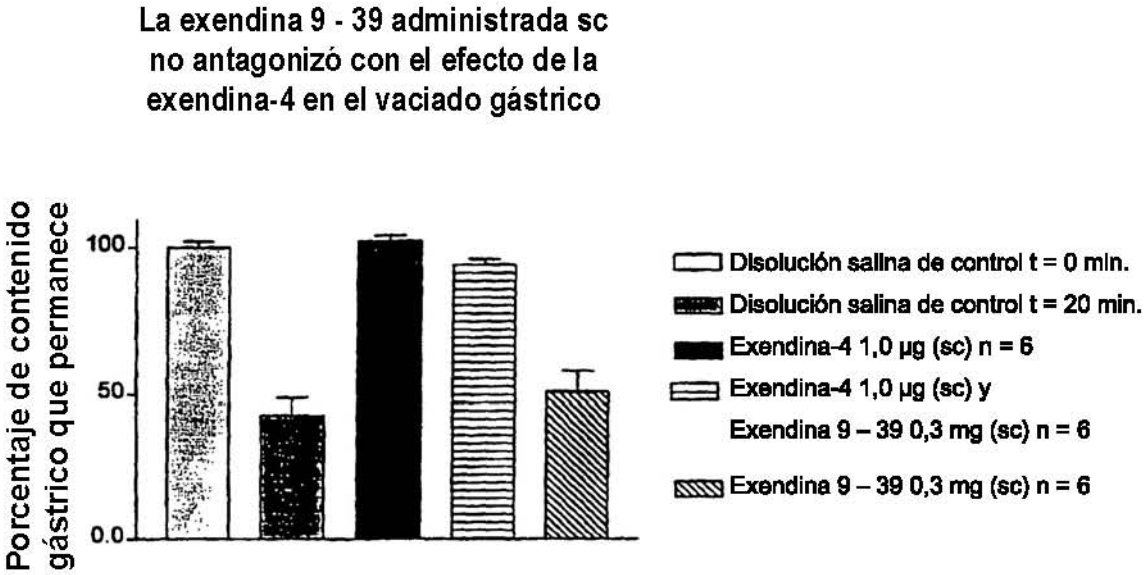

La exendina 9 - 39 administrada sc
no antagonizó con el efecto de la
exendina-4 en el vaciado gástrico
Porcentaje de contenido
gástrico que permanece
100
50
0.0
Disolución salina de control t = 0 min.
Disolución salina de control t = 20 min.
Exendina-4 1,0 µg (sc) n = 6
Exendina-4 1,0 µg (sc) y
Exendina 9 – 39 0,3 mg (sc) n = 6
Exendina 9 – 39 0,3 mg (sc) n = 6

Figura 5

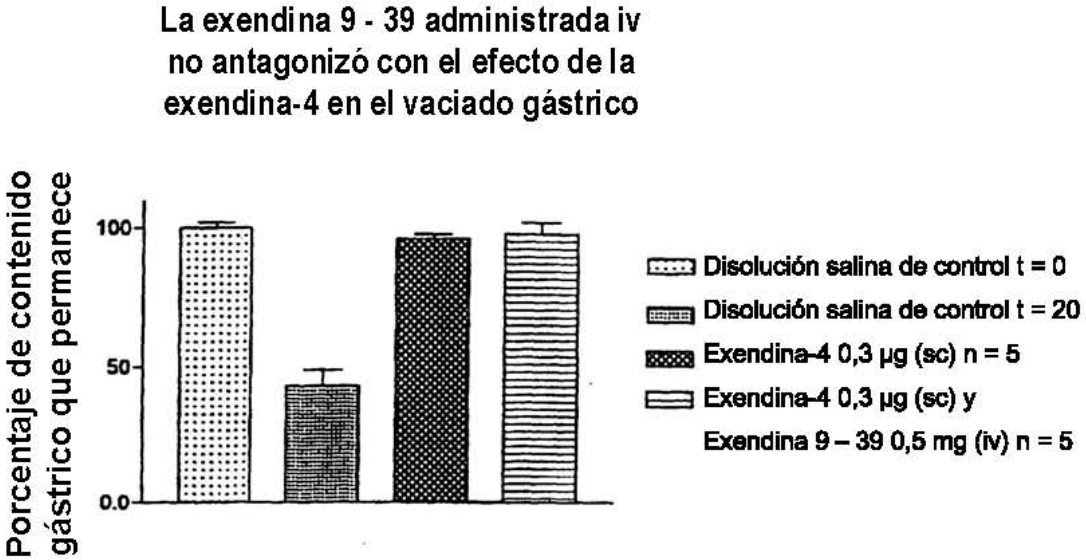

La exendina 9 - 39 administrada iv
no antagonizó con el efecto de la
exendina-4 en el vaciado gástrico
Porcentaje de contenido
gástrico que permanece
100
50
0.0
Disolución salina de control t = 0
Disolución salina de control t = 20
Exendina-4 0,3 µg (sc) n = 5
Exendina-4 0,3 µg (sc) y
Exendina 9 – 39 0,5 mg (iv) n = 5

Figura 6

La exendina 9 - 39 administrada sc no antagonizó con el efecto de GLP-1 en el vaciado gástrico

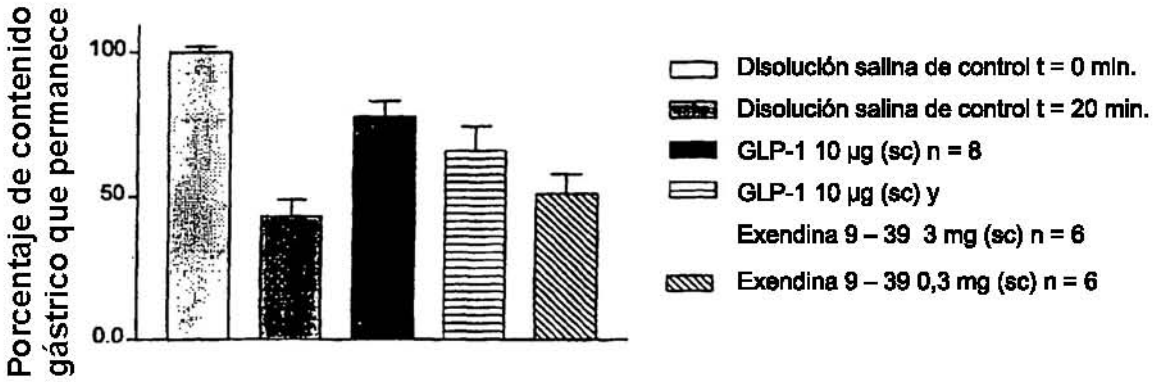
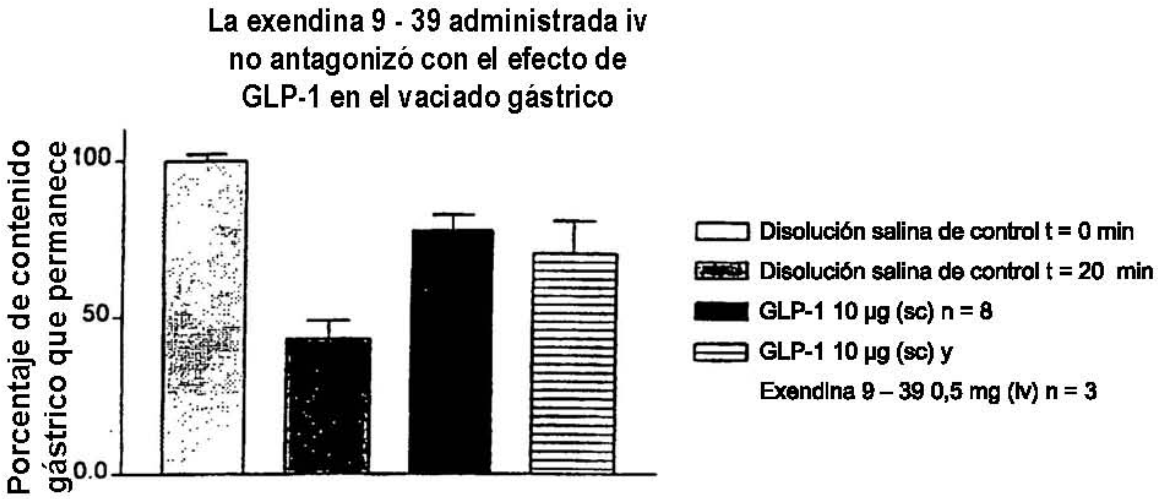


Figura 7


La exendina 9 - 39 administrada iv
no antagonizó con el efecto de
GLP-1 en el vaciado gástrico
Porcentaje de contenido gástrico que permanece
100
50
0.0
Disolución salina de control t = 0 min
Disolución salina de control t = 20 min
GLP-1 10 µg (sc) n = 8
GLP-1 10 µg (sc) y
Exendina 9 – 39 0,5 mg (iv) n = 3