

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 559**

51 Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.1998** **E 05011978 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013** **EP 1629849**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden las exendinas y los agonistas de las mismas**

30 Prioridad:

07.01.1997 US 34905 P

08.08.1997 US 55404 P

14.11.1997 US 66029 P

14.11.1997 US 65442 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2013

73 Titular/es:

AMYLIN PHARMACEUTICALS, LLC (50.0%)

9360 Towne Centre Drive

San Diego, CA 92121, US y

ASTRAZENECA PHARMACEUTICALS LP (50.0%)

72 Inventor/es:

BEELEY, NIGEL ROBERT ARNOLD;

PRICKETT, KATHRYN S y

BHAVSAR, SUNIL

74 Agente/Representante:

MANRESA VAL, Manuel

ES 2 425 559 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

Composiciones farmacéuticas que comprenden las exendinas y los agonistas de las mismas.

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional US n.º 60/034.905, presentada el 7 de enero de 1997, la solicitud provisional US n.º 60/055.404, presentada el 8 de agosto de 1997, la solicitud provisional US n.º 60/066.029, presentada el 14 de noviembre de 1997, y la solicitud provisional US n.º 60/065.442, presentada el 14 de noviembre de 1997.

10 Campo de la invención

- 15 La presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades o trastornos que se pueden aliviar reduciendo la ingesta alimenticia que comprende la administración de una cantidad efectiva de exendina o de un agonista de la exendina sola o junto con otros compuestos o composiciones que afecten la saciedad tales como la leptina o un agonista de la amilina. Estos resultan útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos, en los que puede resultar valiosa la reducción de la ingesta alimenticia, entre ellos la obesidad, la diabetes tipo 2, trastornos alimentarios y el síndrome de la resistencia a la insulina. Resultan útiles asimismo para disminuir el nivel de lípidos en plasma, reducir el riesgo cardíaco, reducir el apetito y reducir el peso de los pacientes. Se dan a conocer asimismo composiciones farmacéuticas para utilizar en los tratamientos de la presente invención.

20 Antecedentes

- 25 La descripción siguiente resume la información relevante para la presente invención. No significa la admisión de que la información proporcionada en la presente memoria se trata de técnicas anteriores a la invención que ahora se reivindica, ni de que cualquiera de las publicaciones a las que se hace referencia específica o implícitamente son técnicas anteriores a la presente invención.

Exendina

- 30 Las exendinas son péptidos que se encuentran en el veneno del monstruo de Gila (*Gila monster*), un lagarto que se encuentra en Arizona, y del monstruo verde mejicano (*Mexican Beaded Lizard*). La exendina-3 se encuentra presente en el veneno del *Heloderma horridum* (monstruo verde mejicano) y la exendina-4 se encuentra en el veneno del *Heloderma suspectum* (monstruo de Gila) (Eng, J., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265:20259-62, 1990; Eng, J., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:7402-05, 1992). 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, conocido asimismo como proglucagón [78 – 107], desempeña un efecto insulínico, estimulando la secreción de insulina de las células β del páncreas; el GLP 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 también la secreción de insulina en humanos (Orskov, *et al.*, *Diabetes*, 42:658-61, 1993). Se ha publicado que una proteína G transmembrana receptora de la adenilato ciclasa que se considera responsable del efecto insulínico del GLP-1 se ha clonado a partir de una estirpe de células β (Thorens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:8641-45 (1992)).

- 50 La exendina-4 se fija fuertemente a 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 ha dado a conocer 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). Se ha propuesto el uso de la exendina-3 y de la exendina-4 como agentes insulínicos para el tratamiento de la diabetes mellitus y la prevención de la hiperglucemia (Eng, patente US n° 5.424.286).

- 60 Se ha publicado que los péptidos de exendina truncados en el extremo carboxílico tales como la exendina [9 - 39], una molécula carboxiamidada, y los fragmentos desde el 3 - 39 hasta el 9 - 39 son antagonistas del GLP-1 potentes y selectivos (Goke, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268:19650-55, 1993; Raufman, J.P., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:2897-902, 1991; Schepp, W., *et al.*, *Eur. J. Pharm.*, 269:183-91, 1994; Montrose-Rafizadeh, *et al.*, *Diabetes*, 45 (Suppl. 2): 152A, 1996). Se ha comentado que la exendina [9 - 39] 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). Se ha publicado la clonación, a partir de las células de los islotes pancreáticos de rata, del receptor presuntamente responsable del efecto insulínico del GLP-1 en ratas (Thorens, B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

89:8641-8645, 1992). Se comenta que las exendinas y la exendina [9 – 39] se fijan al receptor clonado del GLP-1 (el receptor del GLP-1 en las células β pancreáticas de rata (Fehmann HC, *et al.*, Peptides 15 (3): 453-6, 1994) y el receptor del GLP-1 humano (Thorens B, *et al.*, Diabetes 42 (11): 1678-82, 1993)). En relación con las células sometidas a transfección con el receptor clonado del GLP-1, se ha publicado que la exendina-4 es un agonista, es decir, que aumenta el AMPc, al mismo tiempo que se identifica la exendina [9 – 39] como antagonista, es decir, que bloquea las acciones estimuladoras de la exendina-4 y del GLP-1. Id.

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 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 también publicado 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).

Se ha descubierto recientemente que las exendinas inhiben el vaciado gástrico (USSN 08/694.954, presentada el 8 de agosto de 1996, que posee la propiedad común con la presente invención y se incorpora en la presente memoria por referencia).

Se ha empleado la exendina [9 – 39] para investigar la importancia fisiológica del GLP-1 central en el control de la ingesta alimenticia (Turton, M. D. *et al.*, Nature, 379:69-72, 1996). El GLP-1 administrado por inyección vía intracerebroventricular inhibe la ingesta alimenticia en las ratas. Se ha publicado que dicho efecto inductor de la saciedad por parte del GLP-1 administrado por vía ICV se inhibe con la inyección ICV de exendina [9 – 39] (Turton, *supra*). Sin embargo, se ha publicado que el GLP-1 no inhibe la ingesta en ratones cuando se les administra mediante inyección periférica (Turton, M. D., Nature, 379:69-72, 1996; Bhavsar, S. P., Soc. Neurosci. Abstr. 21:460 (188.8), 1995).

Obesidad e hipernutrición

La obesidad, el exceso de tejido adiposo, se está convirtiendo en un trastorno diagnosticado en un número de casos cada vez mayor en las sociedades desarrolladas. Por ejemplo, se calculó que aproximadamente el 30% de los adultos en los EE. UU. se encontraban un 20% por encima del peso corporal ideal, un valor de obesidad aceptado como para suponer un riesgo para la salud (*Harrison's Principles of Internal Medicine* ("Principios de Medicina Interna de Harrison") 12ª edición, McGraw Hill, Inc. (1991) p. 411). Se considera que la patogenia de la obesidad es multifactorial pero el problema básico es que en los pacientes obesos la ingesta alimenticia y el gasto energético no se encuentran equilibrados hasta que hay un exceso de tejido adiposo. Los intentos de reducción de la ingesta alimenticia o de la hipernutrición son habitualmente infructuosos a medio plazo debido a que la pérdida de peso producida por la dieta provoca tanto un aumento en el apetito como un descenso en el gasto energético (Leibel *et al.*, (1995) New England Journal of Medicine 322: 621-628). La intensidad del ejercicio físico requerido para gastar la energía suficiente como para perder materialmente masa adiposa es demasiado grande para poder ser asumida por la mayoría de las personas con suficiente regularidad. De este modo, la obesidad es actualmente un trastorno metabólico de tratamiento poco eficaz, crónico, básicamente intratable. No se considera únicamente la obesidad por sí misma como indeseable por motivos estéticos, sino que la obesidad supone también un riesgo grave de comorbilidades, entre ellas la diabetes de tipo 2, el aumento del riesgo cardíaco, la hipertensión arterial, la aterosclerosis, la artrosis y un aumento en la frecuencia de complicaciones quirúrgicas cuando se utiliza la anestesia general. La obesidad debida a la hipernutrición constituye asimismo un factor de riesgo para el grupo de trastornos denominados síndrome de la resistencia a la insulina, o "síndrome X". En el síndrome X, se ha dado a conocer que existe una relación entre la resistencia a la insulina y la hipertensión arterial (Watson N. y Sandler M., Curr. Med. Res. Opin., 12(6): 374-378 (1991); Kodama J. *et al.*, Diabetes Care, 13(11): 1109-1111 (1990); Lithell *et al.*, J. Cardiovasc. Pharmacol., 15 Supl. 5: S46-S52 (1990)).

En aquellos pocos pacientes que consiguen perder peso, aproximadamente un 10 por ciento del peso corporal, pueden producirse mejoras notables en los trastornos comórbidos, sobre todo en la diabetes de tipo 2 en la que la dieta y la pérdida de peso constituyen el modo terapéutico primario, aunque relativamente ineficaz en muchos pacientes por las razones indicadas anteriormente. La reducción de la ingesta alimenticia en los pacientes obesos produce la disminución del nivel de glucosa en plasma, del nivel de lípidos en plasma y del riesgo cardíaco en dichos pacientes. La hipernutrición es también el resultado, y la causa psicológica, de muchos trastornos alimenticios. La reducción de la ingesta alimenticia resultará también beneficiosa en el tratamiento de dichos trastornos.

De este modo, se comprenderá que unos medios efectivos para reducir la ingesta alimenticia constituyen un reto importante y que un método superior de tratamiento sería de gran utilidad. Dicho método, y los compuestos y composiciones que son útiles para el mismo, se han inventado y se describen y reivindican en el presente documento.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que las exendinas y los agonistas de la exendina

presentan un efecto profundo y prolongado en la inhibición de la ingesta alimenticia.

La presente invención se refiere a nuevos tratamientos de enfermedades o trastornos relacionados con la hipernutrición, que comprenden la administración de una exendina, por ejemplo, la exendina-4 [SEC ID n.º 2: His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser] que se fija efectivamente al receptor sobre el que la exendina ejerce su acción reduciendo la ingesta alimenticia. Ello resultará útil en el tratamiento de, por ejemplo, la obesidad, la diabetes, comprendiendo la diabetes de tipo 2 o diabetes no insulino dependiente, los trastornos alimenticios y el síndrome de resistencia a la insulina.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la exendina-4, una disolución amortiguadora y un agente de isotonicidad, en la que la composición presenta un pH comprendido entre 3,5 y 5,0.

Preferentemente, la disolución amortiguadora comprende una disolución amortiguadora de acetato.

Preferentemente, el agente de isotonicidad se selecciona de entre el grupo que comprende cloruro sódico, dextrosa, ácido bórico, tartrato sódico, propilenglicol, polioles y cualquier combinación de los mismos.

Se prefiere asimismo que la composición comprenda además un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable seleccionado de entre el grupo que consiste en carbonato de calcio, fosfato de calcio, lactosa, glucosa, sacarosa, almidón, derivados de la celulosa, gelatina, aceites, macrogol y cualquier combinación de los mismos.

En una forma de realización, la composición comprende además por lo menos una sustancia adicional seleccionada de entre el grupo que comprende un agonista de la amilina, una leptina o una colecistoquinina (CCK).

En una forma de realización adicional, la composición comprende amilina humana, ^{25,28,29} Pro amilina humana, CCK-8 o calcitonina de salmón.

Preferentemente, la composición se formula para una administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, oral, tópica, transmucosa o pulmonar.

Se proporciona además un producto que comprende una composición según la presente invención y una sustancia adicional seleccionada de entre el grupo que consiste en la amilina, un agonista de la amilina, una leptina o una colecistoquinina (CCK), para un uso simultáneo o independiente.

La presente invención proporciona asimismo una composición en una presentación unitaria apta para administrar entre 10 µg y 500 µg al día de exendina-4 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en una dosis unitaria o en dosis fraccionadas, suspendida en una disolución amortiguadora isotónica a un pH comprendido entre 3,5 y 5,0.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades o trastornos que se pueden aliviar reduciendo la ingesta alimenticia en un paciente que comprende la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de una exendina.

Por "enfermedad o trastorno que puede aliviarse reduciendo la ingesta alimenticia" se entiende cualquier enfermedad o trastorno de un paciente que esté causado, o se complique, o se agrave por una ingesta alimenticia relativamente elevada, o que puede aliviarse reduciendo la ingesta alimenticia. Dichas enfermedades o trastornos comprenden, pero sin limitarse a los mismos, la obesidad, la diabetes, comprendiendo la diabetes tipo II, los trastornos alimenticios y el síndrome de resistencia a la insulina.

En una primera forma de realización, la presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades o trastornos que se pueden aliviar reduciendo la ingesta alimenticia en un paciente que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de una exendina.

Preferentemente, el paciente es un vertebrado, más preferentemente un mamífero y aún más preferentemente un ser humano. En los aspectos preferidos, la exendina o el agonista de la exendina se administra por vía parenteral, más preferentemente mediante una inyección. En el aspecto más preferido, la inyección es una inyección periférica. Preferentemente se administran por día de 10 µg – 30 µg a 5 mg de exendina o de agonista de la exendina. Más preferentemente, se administran por día de 10 µg – 30 µg a 2 mg, o de 10 µg – 30 µg a 1 mg de exendina o de agonista de la exendina. Más preferentemente, se administran por día de 30 µg a 500 µg de exendina o de agonista de la exendina.

En varias formas de realización de la presente invención, la enfermedad o trastorno es la obesidad, la diabetes, preferentemente la diabetes tipo 2, un trastorno alimenticio o el síndrome de resistencia a la insulina.

En otros aspectos preferidos de la presente invención, se proporciona la reducción del apetito de un paciente que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad de una exendina que reduzca el apetito.

En otros aspectos preferidos adicionales, se proporciona la disminución de lípidos plasmáticos que comprende la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de una exendina.

La presente invención también se puede referir asimismo a la reducción del riesgo cardíaco de un paciente, comprendiendo la administración a dicho paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de una exendina. En un aspecto preferido, la exendina es la exendina-4.

En la presente invención, las exendinas se pueden administrar por separado o junto con uno o más compuestos y composiciones distintas que realicen una acción de saciedad a largo plazo o a corto plazo, comprendiendo, pero sin limitarse a los mismos, otros compuestos o composiciones que comprenden un agonista de la amilina, la colecistoquinina (CCK), o una leptina (proteína ob). Los agonistas aptos de la amilina comprenden, por ejemplo, la [^{25,28,29}Pro-] amilina humana (también conocida como "pramintida", y a la que previamente se hacía referencia como "AC-137"), tal como se describe en la patente US n.º 5.686.511 "Amylin Agonist Peptides and Uses Therefor" ("Péptidos agonistas de la amilina y utilización de los mismos") publicada el 11 de noviembre de 1997, y la calcitonina de salmón. La CCK utilizada es preferentemente la CCK octopéptido (CCK-8). La leptina se trata en, por ejemplo Pellemounter, M.A., *et al.* *Science* 269: 540-43 (1995); Halaas, J.L., *et al.* *Science* 269:543-46 (1995); y Campfield, L.A., *et al.* *Eur. J. Pharmac.* 262:133-41 (1994).

En otras formas de realización de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica para utilizar en el tratamiento de enfermedades o trastornos que se pueden aliviar mediante la reducción de la ingesta alimenticia que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una exendina o de un agonista de la exendina junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva para un paciente humano.

La composición farmacéutica se puede utilizar preferentemente para reducir el apetito de un paciente, reducir el peso de un paciente, disminuir el nivel de lípidos en plasma de un paciente o reducir el riesgo cardíaco de un paciente. Los expertos en la materia reconocerán que la composición farmacéutica comprenderá preferentemente una cantidad terapéuticamente efectiva de exendina o de agonista de la exendina para alcanzar el efecto deseado en el paciente.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además uno o más compuestos y composiciones distintas que presenten una acción de saciedad a largo plazo o a corto plazo, comprendiendo, pero sin limitarse a los mismos, otros compuestos y composiciones que comprenden un agonista de la amilina, CCK, preferentemente CCK-8, o leptina. Los agonistas de la amilina aptos comprenden, por ejemplo, la [^{25,28,29}Pro-] amilina humana y la calcitonina de salmón.

En un aspecto preferido, la composición farmacéutica comprende la exendina-4.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una representación gráfica de las variaciones en la ingesta alimenticia en ratones normales tras la inyección intraperitoneal de exendina-4 y GLP-1.

La Figura 2 es una representación gráfica de las variaciones en la ingesta alimenticia en ratones obesos tras la inyección intraperitoneal de exendina-4.

La Figura 3 es una representación gráfica de las variaciones en la ingesta alimenticia en ratas tras la inyección intracerebroventricular de exendina-4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las exendinas resultan útiles tal como se han descrito en la presente memoria a la vista de sus propiedades farmacológicas. Los efectos de las exendinas en la reducción de la ingesta alimenticia pueden identificarse, determinarse o seleccionarse utilizando los métodos descritos a continuación en los ejemplos, u otros métodos conocidos en la técnica para determinar sus efectos en la ingesta alimenticia o en el apetito.

Definiciones

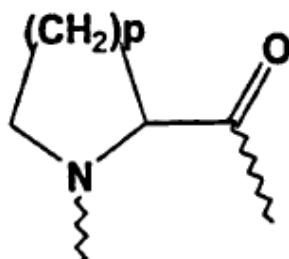
Según la presente invención y tal como se emplean en el presente documento, los siguientes términos se definen con los siguientes significados excepto cuando se indique explícitamente de otro modo.

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 y 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, pero no sin

limitarse a los mismos, el ácido azetidinecarboxílico, el ácido 2-aminoadípico, el ácido 3-aminoadípico, la β -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, alo-hidroxilisina, la 3-hidroxiprolina, la 4-hidroxiprolina, la isodesmosina, la aloisoleucina, 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 piperídico y la tioprolina. Los análogos de los aminoácidos comprenden los aminoácidos naturales y sintéticos que se han bloqueado químicamente, reversible o irreversiblemente, o se han modificado en su grupo aminoterminal o en sus grupos de cadena lateral, como por ejemplo, la metionina sulfóxido, la metionina sulfona, la S-(carboximetil)-cisteína, la S-(carboximetil)-cisteína sulfóxido y la S-(carboximetil)-cisteína sulfona.

El término "análogo aminoácido" se refiere a un aminoácido en el que tanto el grupo carboxilo carboxiterminal, el grupo amino aminoterminal o el grupo funcional de cadena lateral se ha codificado químicamente en otro grupo funcional. Por ejemplo el ácido aspártico – (beta-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 con 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 la que p es 1, 2 o 3 representando respectivamente residuos del ácido azetidinecarboxílico, de la prolina o del ácido piperídico.

El término "inferior" al que nos referimos en la presente memoria 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 la presente memoria obtenidas a partir de la combinación de dichos compuestos y un ácido orgánico o inorgánico. En la práctica, el uso de la forma salina equivale a utilizar la forma básica. Los compuestos resultan útiles tanto en forma de base libre como en forma salina.

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

- "ACN" o "CH₃CN" se refiere al acetonitrilo.
- "Boc", "tBoc" o "Tboc" se refiere al t-butoxicarbonilo.
- "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.
- "3Hyp" se refiere a la 3-hidroxiprolina.
- "4Hyp" se refiere a la 4-hidroxiprolina.
- "NAG" se refiere a la N-alquilglicina.
- "NAPG" se refiere a la N-alquilpentilglicina.
- "Norval" se refiere a la norvalina.
- "Norleu" se refiere a la norleucina.

Preparación de los compuestos

Las exendinas descritas en el presente documento se pueden preparar empleando técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida normales y preferentemente un sintetizador de péptidos automático o semiautomático. Por regla general, empleando dichas técnicas, se enlazan un aminoácido protegido por el grupo α -N-carbamoil y un aminoácido unido a la cadena peptídica en crecimiento, a una resina, a temperatura ambiente 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 diciclohexilcarbodiimida y el 1-hidrozibenzotriazol en presencia de una base tal como la diisopropiletilamina. El grupo protector α -N-carbamoil 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-prottegido deseado para ser añadido a la cadena peptídica. Los grupos N-protectores aptos son muy conocidos en la técnica, siendo los preferidos en este caso el t-butiloxicarbonil (tBoc) y el fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc).

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

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

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

Los compuestos peptídicos útiles en la presente invención se pueden preparar asimismo empleando técnicas de ADN recombinante, utilizando métodos actualmente conocidos 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). Los compuestos no peptídicos útiles en la presente invención pueden prepararse utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los aminoácidos que contengan fosfato y los péptidos que contengan dichos aminoácidos pueden prepararse utilizando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Bartlett y Landen, *Biorg. Chem.* 14:356-377 (1986).

Las formulaciones descritas anteriormente son útiles teniendo en cuenta sus propiedades farmacológicas. En concreto, los compuestos de la invención presentan actividad como agentes para reducir la ingesta alimenticia. Pueden utilizarse para tratar enfermedades o trastornos que pueden aliviarse reduciendo la ingesta alimenticia.

Los compuestos útiles de la presente invención pueden presentarse 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 reductora de la ingesta alimenticia, reductora del nivel de glucosa en plasma o un agente reductor del nivel de lípidos en sangre, tal como la amilina, un agonista de la amilina, una CCK, o una leptina, en una composición o disolución única para su administración conjunta. En otros casos, resultará más ventajoso administrar el agente adicional

separadamente de dicha exendina o agonista de la exendina. El formato de administración adecuado lo puede determinar de un mejor modo el médico para cada paciente individualmente. Los transportadores farmacéuticamente aceptables y sus formulaciones se describen en los tratados normales de formulación farmacéutica, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences* ("Ciencia Farmacéutica de Remington") por E.W. Martin. 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 nº 10, Supl. 42:2S (1988).

Los compuestos útiles en la presente invención pueden suministrarse como composiciones parenterales aptas para su inyección o venoclisis. Generalmente, pueden, por ejemplo, suspenderse en un aceite inerte, siendo adecuado un aceite vegetal tal como el aceite de sésamo, de cacahuete, de oliva o cualquier otro transportador aceptable. Preferentemente, se suspenden en un transportador acuoso, por ejemplo, en una solución amortiguadora isotónica a un pH comprendido entre 3,5 y 5,0. Dichas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales o pueden filtrarse en medio estéril. Las composiciones pueden comprender sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes amortiguadores del pH. Los amortiguadores útiles comprenden, por ejemplo, las disoluciones amortiguadoras de acetato de sodio / ácido acético. Puede utilizarse una forma de preparación de liberación lenta a modo de depósito o "almacén" de tal modo que las cantidades terapéuticamente efectivas de la preparación lleguen a la corriente sanguínea durante varias horas o días tras la inyección transdérmica u otra forma de administración.

La isotonicidad pretendida 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 (tales como el manitol y el sorbitol) u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro sódico es el preferido especialmente para soluciones amortiguadoras que contienen iones de sodio.

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

Se pueden utilizar asimismo transportadores o excipientes para facilitar la administración del compuesto. Los ejemplos de transportadores y excipientes comprenden el carbonato de calcio, el fosfato de calcio, diversos glúcidos como la lactosa, la glucosa, o la sacarosa, o tipos de almidón, derivados de la celulosa, gelatina, aceites vegetales, macrogles 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, transmucosa o mediante inhalación pulmonar.

Si se pretende de este modo, las soluciones de las composiciones de las anteriores dosificaciones pueden espesarse mediante un agente espesante tal como la hipromelosa. Pueden prepararse en forma de emulsión, tanto de agua en aceite como de aceite en agua. Puede emplearse una amplia variedad de agentes emulsionantes farmacéuticamente aceptables que comprenden, por ejemplo, la goma arábiga, o un agente 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 forma general. Por ejemplo, los componentes seleccionados se pueden mezclar simplemente en una máquina mezcladora o en cualquier otro aparato estándar para producir una mezcla concentrada que puede ajustarse a la concentración y viscosidad finales mediante la adición de agua o de un agente espesante y posiblemente una solución amortiguadora para controlar el pH o un soluto adicional para controlar la tonicidad.

Para que el médico pueda utilizarlos, los compuestos se suministraran en una forma farmacéutica que contiene una cierta cantidad de exendina, por ejemplo, exendina-4, con o sin otro agente reductor de la ingesta alimenticia, un

agente que disminuya el nivel de glucosa en plasma o un agente que disminuya el nivel de lípidos en plasma. Las cantidades de exendina o de un agonista de la exendina terapéuticamente efectivas para utilizar en la reducción de la ingesta alimenticia son las que contienen el apetito al nivel pretendido. Tal como reconocerán los expertos en la materia, la cantidad efectiva de fármaco variará en función de diversos factores, entre ellos la edad y el peso del paciente, el estado físico del paciente, el nivel de glúcidos en sangre y de otros factores.

La dosificación de los compuestos diaria efectiva para contener el apetito se encontrará normalmente comprendida desde aproximadamente entre 10 µg a 30 µg hasta aproximadamente 5 mg/día, preferentemente, desde aproximadamente entre 10 µg y 30 µg hasta aproximadamente 2 mg/día y más preferentemente aproximadamente entre 10 µg y 100 µg hasta aproximadamente 1 mg/día, en el caso más preferente aproximadamente entre 30 µg y aproximadamente 500 µg/día para un paciente de 70 kg administrada en dosis únicas o fraccionadas. La dosis exacta a administrar la determina el médico adjunto dependiendo de dónde se encuentra el compuesto en particular dentro de los intervalos indicados anteriormente, de la edad, el peso o el estado del paciente. La administración ha de empezar cuando se pretenda contener la ingesta alimenticia o perder peso, por ejemplo, cuando aparecen los primeros síntomas o poco después de que se ha diagnosticado obesidad, *diabetes mellitus* o el síndrome de resistencia a la insulina. La administración puede realizarse por inyección, preferentemente subcutánea o intramuscular. Los compuestos activos orales pueden tomarse por vía oral, sin embargo las dosificaciones se deben aumentar de 5 a 10 veces.

En una forma de realización, la composición de la presente invención se formula para proporcionar una dosificación diaria comprendida entre 10 µg y 5 mg de exendina-4 en una dosis única o fraccionada.

En una forma de realización adicional, la composición de la presente invención se formula para proporcionar una dosificación diaria comprendida entre 10 µg y 2 mg de exendina-4 en una dosis única o fraccionada.

En otra forma de realización adicional, la composición de la presente invención se formula para proporcionar una dosificación diaria comprendida entre 10 µg y 1 mg de exendina-4 en una dosis única o fraccionada.

En otra forma de realización adicional, la composición de la presente invención se formula para proporcionar una dosificación diaria comprendida entre 30 µg y 500 µg de exendina-4 en una dosis única o fraccionada.

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 concreto, el efecto pretendido y el tipo de paciente. Aunque los compuestos se emplearán habitualmente para tratar pacientes humanos, pueden utilizarse asimismo para tratar enfermedades similares o idénticas en otros vertebrados tales como primates, animales de granja como los cerdos, ganado y aves de corral, y animales de caza y domésticos como caballos, perros y gatos.

Para ayudar a la comprensión de la presente invención se proporcionan los siguientes Ejemplos. Los experimentos relacionados con la presente invención, por supuesto, no deben interpretarse como específicamente restrictivos 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 expertos en la materia, se considera que caen en el ámbito de la presente invención tal como se describe en la presente memoria y tal como se reivindica a continuación.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1: Las inyecciones de exendina redujeron la ingesta alimenticia en ratones normales

Se alojaron todos los ratones (ratones suizos NIH) en un ambiente estable de 22 (± 2) °C, y un 60 (± 10) % de humedad y con un ciclo de luz: oscuridad de 12:12, encendiéndose las luces a las 06:00. Los ratones se alojaron en grupos de cuatro en jaulas estándar con acceso a la comida (Teklad: LM 485; Madison, WI) y agua a discreción excepto cuando se indica lo contrario, durante por lo menos dos semanas antes de los experimentos.

Todos los experimentos se realizaron entre las 07:00 h y las 09:00 h. Se privó de alimentos a los ratones (se quitó la comida a las 16:00 h a todos los animales el día anterior al experimento) y se los alojó por separado. Todos los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (5 µl/kg) de una disolución salina o de exendina-4 a unas dosis de 0,1, 1,0, 10 y 100 µg/kg e inmediatamente se presentó a los animales la comida en forma de bolita pesada previamente (Teklad LM 485). La bolita de alimento se pesó a intervalos de 30 minutos, 1 h, 2 h y 6 h para determinar la cantidad de comida consumida.

La Figura 1 representa la ingesta alimenticia acumulativa en períodos de 0,5, 1, 2 y 6 h en ratones normales suizos NIH tras ayunar toda la noche a continuación de una inyección intraperitoneal de disolución salina, 2 dosis de GLP-1, o 4 dosis de exendina-4. Con las dosis de hasta 100 µg/kg, el GLP-1 no produjo efecto alguno en la ingesta alimenticia determinada con cualquier tipo de período, un resultado coherente con las publicaciones anteriores (Bhavsar, S.P., *et al.*, Soc. Neurosci. Abstr., 21:460 (188.8) (1995); y Turton, M.D., Nature, 379:69-72, (1996)).

En cambio, las inyecciones de exendina-4 inhibieron la ingesta alimenticia de forma eficaz y dependiente de la dosis. La DE₅₀ para la inhibición de la ingesta alimenticia durante 30 minutos fue de 1 µg/kg, que es un nivel aproximadamente tan eficaz como el de la amilina (DE₅₀ de 3,6 µg/kg) o el agente de la saciedad periférico

prototípico, CCK, (DE_{50} de 0,97 µg/kg) tal como se determinó en esta preparación. Sin embargo, a diferencia de los efectos de la amilina o la CCK, que disminuyen después de 1 – 2 horas, la inhibición de la ingesta alimenticia con la exendina-4 aún tenía lugar por lo menos 6 horas después de la inyección.

5 EJEMPLO DE REFERENCIA 2: las inyecciones de exendina redujeron la ingesta alimenticia en ratones obesos

10 Se alojaron todos los ratones (hembras de ratones ob/ob) en un ambiente estable de 22 ($\pm$ 2) °C, y un 60 ($\pm$ 10) % de humedad y con un ciclo de luz: oscuridad de 12:12, encendiéndose las luces a las 06:00. Los ratones se alojaron en grupos de cuatro en jaulas estándar con acceso a la comida (Teklad: LM 485) y agua a discreción excepto cuando se indica lo contrario, durante por lo menos dos semanas antes de los experimentos.

15 Todos los experimentos se realizaron entre las 07:00 h y las 09:00 h. Se privó de alimentos a los ratones (se quitó la comida a las 16:00 h a todos los animales el día anterior al experimento) y se los alojó por separado. Todos los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (5 µl/kg) de una disolución salina o de exendina-4 a unas dosis de 0,1, 1,0 y 10 µg/kg (ratones hembra ob/ob) e inmediatamente se presentó a los animales la comida en forma de bolita pesada previamente (Teklad LM 485). La bolita de alimento se pesó a intervalos de 30 minutos, 1 h, 2 h y 6 h para determinar la cantidad de comida consumida.

20 La Figura 2 representa el efecto de la exendina-4 en el ratón con el modelo de obesidad ob/ob. Dichos ratones obesos presentaron una respuesta relacionada con la ingesta alimenticia similar a la de la exendina en los ratones normales. Además, dichos ratones obesos no resultaron hipersensibles a la exendina, tal como se ha observado con la amilina y con la leptina (Young, A.A., *et al.*, Program and Abstracts, 10º Congreso Internacional de Endocrinología, 12 a 15 de junio de 1996, San Francisco, p. 419 (P2-58)).

25 EJEMPLO DE REFERENCIA 3: las inyecciones de exendina intracerebroventriculares redujeron la ingesta alimenticia en ratas

30 Se alojaron todas las ratas (Harlan Sprague-Dawley) en un ambiente estable de 22 ($\pm$ 2) °C, y un 60 ($\pm$ 10) % de humedad y con un ciclo de luz: oscuridad de 12:12, encendiéndose las luces a las 06:00. Las ratas se obtuvieron de Zivic Miller con una cánula intracerebroventricular (cánula ICV) implantada (las coordenadas determinadas por el peso real de los animales y haciendo referencia a Paxinos, G. y Watson, C. "*The Rat Brain in stereotaxic coordinates*" ("El encéfalo de la rata en coordenadas estereotáxicas"), segunda edición. Academic Press) y se alojaron por separado en jaulas estándar con acceso a la comida (Teklad: LM 485) y agua a discreción durante por lo menos una semana antes de los experimentos.

35 Todas las inyecciones se administraron entre las 17:00 h y las 18:00 h. Se habituó a las ratas al procedimiento de la inyección ICV por lo menos una vez antes de la administración ICV del compuesto. Todas las ratas recibieron una inyección ICV (2 µl/30 segundos) de una disolución salina o de exendina-4 a unas dosis de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 y 1,0 µg. Posteriormente se presentó a los animales la comida en forma de bolita pesada previamente (Teklad LM 485) a las 18:00, cuando se apagaron las luces. La bolita de alimento se pesó a intervalos de 2 h, 12 h y 24 h para determinar la cantidad de comida consumida por cada animal.

40 La Figura 3 representa la inhibición de la ingesta dependiente de la dosis en las ratas que recibieron dosis superiores a 0,1 µg/rata. La DE_{50} fue de aproximadamente 0,1 µg, la exendina-4 resultó por lo tanto aproximadamente 100 veces más potente que las inyecciones intracerebroventriculares de GLP-1 tal como publicó Turton, M.D., *et al.* (Nature 379:69-72 (1996)).

EJEMPLO DE REFERENCIA 4: los agonistas de la exendina redujeron la ingesta alimenticia en ratones

50 Se alojaron todos los ratones (ratones suizos NIH) en un ambiente estable de 22 ($\pm$ 2) °C, y un 60 ($\pm$ 10) % de humedad y con un ciclo de luz: oscuridad de 12:12, encendiéndose las luces a las 06:00. Los ratones se alojaron en grupos en jaulas estándar con acceso a la comida (Teklad: LM 485; Madison, WI) y agua a discreción excepto cuando se indica lo contrario, durante por lo menos dos semanas antes de los experimentos.

55 Todos los experimentos se realizaron entre las 07:00 h y las 09:00 h. Se privó de alimentos a los ratones (se quitó la comida a las 16:00 h a todos los animales el día anterior al experimento) y se los alojó por separado. Todos los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (5 µl/kg) de una disolución salina o de exendina-4 a unas dosis de 1, 10 y 100 µg/kg e inmediatamente se presentó a los animales la comida en forma bolita (Teklad LM 485). La bolita de alimento se pesó a intervalos de 30 minutos, 1 h, 2 h y 6 h para determinar la cantidad de comida consumida.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende la exendina-4, una disolución amortiguadora y un agente de isotonicidad, en la que la composición presenta un pH comprendido entre 3,5 y 5,0.
- 5 2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicha disolución amortiguadora comprende una disolución amortiguadora de acetato.
3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho agente de isotonicidad se selecciona de entre el grupo que comprende cloruro sódico, dextrosa, ácido bórico, tartrato sódico, propilenglicol, polioles y cualquier combinación de los mismos.
- 10 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable seleccionado de entre el grupo que consiste en carbonato de calcio, fosfato de calcio, lactosa, glucosa, sacarosa, almidón, derivados de la celulosa, gelatina, aceites, macrogol y cualquier combinación de los mismos.
- 15 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además por lo menos una sustancia adicional seleccionada de entre el grupo que comprende un agonista de la amilina, una leptina o una colecistoquinina (CCK).
- 20 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además amilina humana, ^{25,28,29} Pro amilina humana, CCK-8 o calcitonina de salmón.
- 25 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha composición se formula para una proporcionar una dosificación diaria comprendida entre 10 µg y 5 mg de exendina-4 en una dosis única o fraccionada.
- 30 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha composición se formula para proporcionar una dosificación diaria comprendida entre 10 µg y 2 mg de exendina-4 en una dosis única o fraccionada.
- 35 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha composición se formula para proporcionar una dosificación diaria comprendida entre 10 µg y 1 mg de exendina-4 en una dosis única o fraccionada.
- 40 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha composición se formula para proporcionar una dosificación diaria comprendida entre 30 µg y 500 µg de exendina-4 en una dosis única o fraccionada.
- 45 11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición se formula para una administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, oral, tópica, transmucosa o pulmonar.
12. Composición farmacéutica en forma de presentación unitaria apta para administrar entre 10 µg y 500 µg al día de exendina-4 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en una dosis unitaria o en dosis fraccionadas, suspendida en una disolución amortiguadora isotónica a un pH comprendido entre 3,5 y 5,0.
- 50 13. Producto que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y una sustancia adicional seleccionada de entre el grupo que consiste en la amilina, un agonista de la amilina, una leptina o una colecistoquinina (CCK), para un uso simultáneo o independiente.

FIG. 1

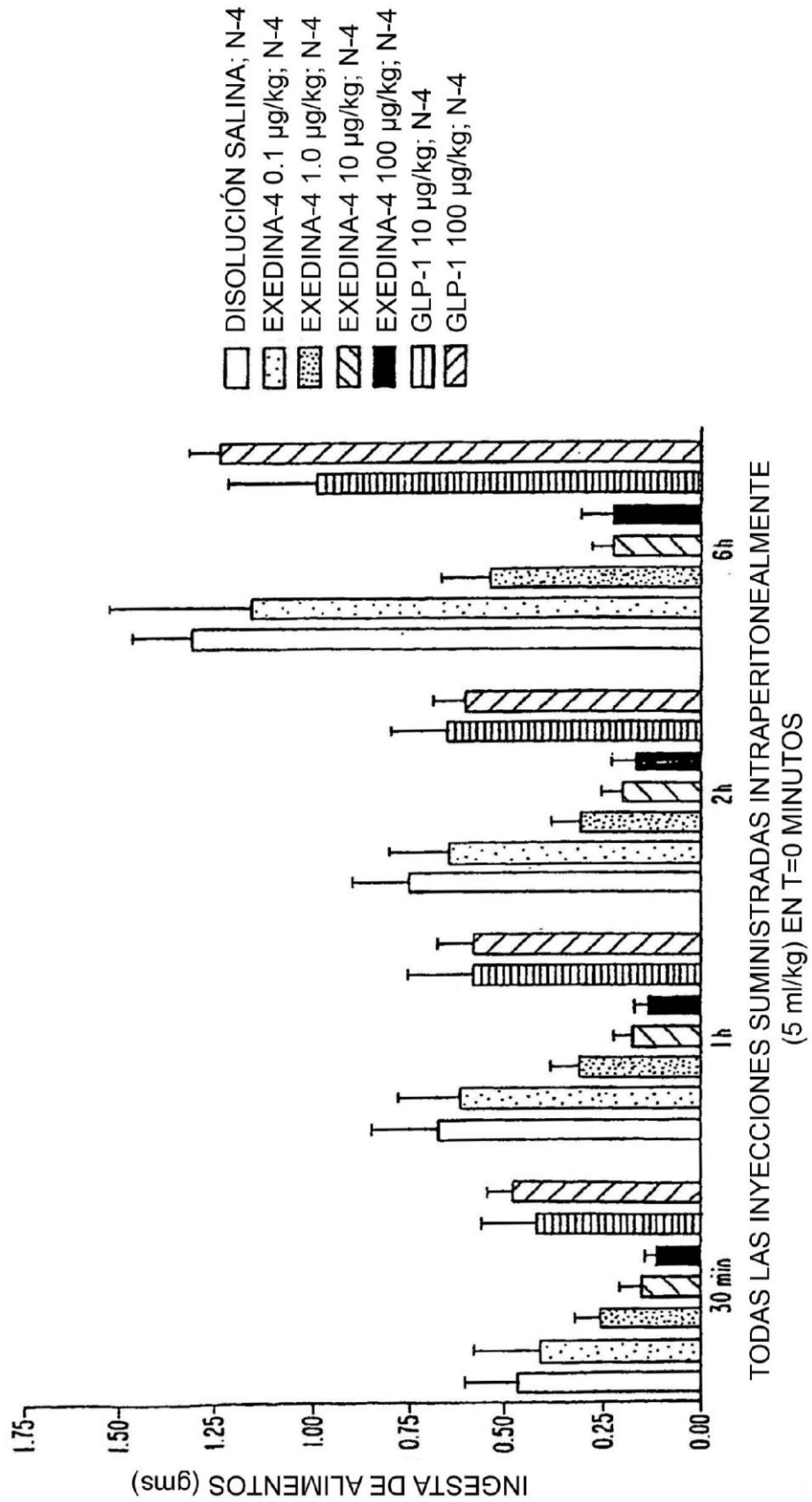


FIG. 2

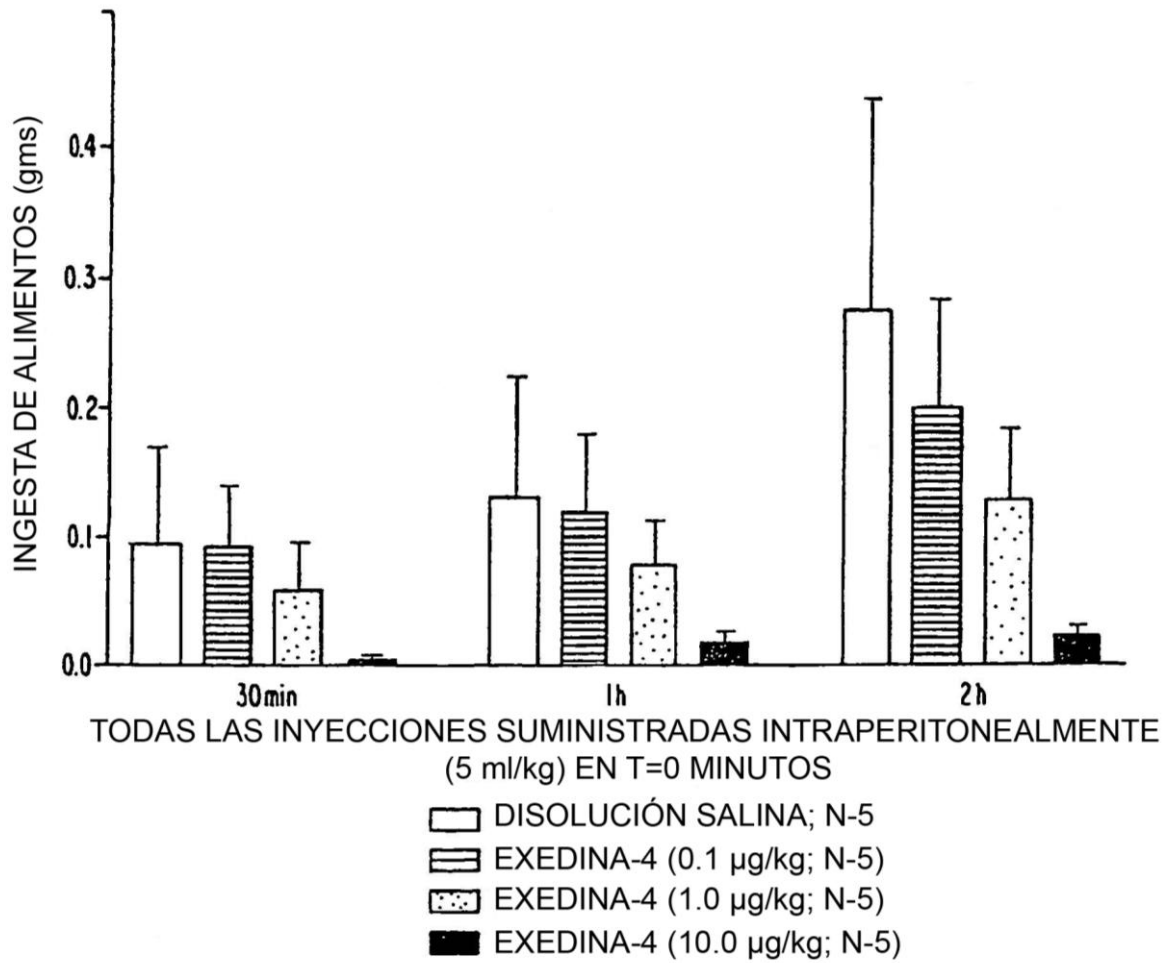


FIG. 3

