

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 499 390**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2008 E 08713063 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2120994**

54 Título: **Métodos y composiciones para tratar trastornos hipoglucémicos**

30 Prioridad:

08.01.2007 US 879033 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2014

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (50.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US y
CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**STOFFERS, DORIS;
DE LEON, DIVA D. y
STANLEY, CHARLES**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 499 390 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para tratar trastornos hipoglucémicos

Declaración con respecto a la investigación o desarrollo patrocinados federalmente

5 La invención descrita en este documento fue financiada en su totalidad o en parte por subvenciones de los Institutos Nacionales de Salud (Grant N ° 1K23DK073663-01). El gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la invención.

Campo de la invención

Esta invención proporciona antagonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) para uso en el tratamiento y mejora de hiperinsulinismo congénito y neonatal.

10 Antecedentes de la invención

15 El hiperinsulinismo congénito (HI) es un trastorno genético de la función de las células pancreáticas β caracterizado por el fracaso para suprimir la secreción de insulina en presencia de hipoglucemia, dando como resultado un daño cerebral o la muerte si se trata inadecuadamente. Las mutaciones de la línea germinal en cinco genes han sido asociadas con el HI: el receptor de sulfonilurea (SUR-1, codificado por *ABCC8*), un canal de potasio rectificador de entrada (Kir6.2, codificado por *KCNJ11*), glucocinasa (*GCK*), glutamato deshidrogenasa (*GLUD-1*) y L-3-hidroxiacil-CoA de cadena corta (SCHAD, codificada por *HADSC*). Las mutaciones con pérdida de función en el canal K_{ATP} (compuesto por dos subunidades: Kir6.2 y SUR-1) son responsables de la forma más común y severa de HI (HI- K_{ATP}), con muchos pacientes que requieren una pancreatometomía casi total para controlar la hipoglucemia, lo que lleva a largas estancias hospitalarias y a complicaciones potencialmente mortales.

20 Se necesitan con urgencia tratamientos eficaces para el HI congénito.

Sumario de la invención

Esta invención proporciona antagonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) para uso en el tratamiento y mejora de hiperinsulinismo congénito y neonatal.

25 Específicamente, esta invención proporciona un antagonista del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) para uso en el tratamiento de hiperinsulinismo congénito, para uso en la reducción de una incidencia de hiperinsulinismo congénito, para uso en el tratamiento de hiperinsulinismo neonatal (HI), o para uso en la reducción de una incidencia de hipoglucemia en un sujeto con HI neonatal, en donde dicho antagonista es el péptido, o un fragmento del péptido, presentado en la Secuencia ID No. 1.

30 En una realización, dicho hiperinsulinismo congénito se puede asociar, o con una anomalía o mutación genética, o con una mutación en un gen que codifica el receptor de sulfonilurea (SUR-1), o con una mutación en el gen que codifica una proteína Kir6.2, o con una mutación en el gen que codifica una proteína seleccionada entre glucocinasa (*GCK*), glutamato deshidrogenasa (*GLUD-1*), y la enzima mitocondrial 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (*HADHSC*).

35 En una realización, dicho HI neonatal puede ser un HI neonatal prolongado. En otra realización, dicho HI neonatal se puede asociar con estrés perinatal. En otras realizaciones, dicho estrés perinatal puede ser bajo peso al nacer para la edad gestacional, o asfixia al nacer.

Breve descripción de las figuras

40 La invención se comprenderá mejor a partir de la lectura de la siguiente descripción detallada tomada conjuntamente con los dibujos en los que se utilizan indicadores a modo de referencia para designar elementos similares, y en los cuales:

45 La Figura 1 muestra la hipoglucemia en ayunas y la alteración de la tolerancia a la glucosa en ratones *SUR-1^{-/-}*. (A) Niveles de glucosa en sangre en ayunas (en mg/dL) en ratones *SUR-1^{-/-}* (n = 27) y en controles naturales de la misma camada (n = 30), p = 0,00000003. (B) Peso corporal (en g) de los ratones *SUR-1^{-/-}* (n = 27) y de los controles naturales de la misma camada (n = 30). (C) Tolerancia a la glucosa oral (2 g/kg) en ratones *SUR-1^{-/-}* (n = 23) (línea continua y círculos) y en controles naturales de la misma camada (n = 25) (línea discontinua y cuadrados abiertos), p < 0,0001, ANOVA de medidas repetidas. (D) Secreción de insulina en respuesta a una carga de glucosa oral (2 g/kg) en ratones *SUR-1^{-/-}* (n = 8) (línea sólida y círculos) en comparación con controles naturales de la misma camada (n = 9) (línea discontinua y cuadrados abiertos), p = 0,02, ANOVA de medidas repetidas;

50 La Figura 2 muestra los niveles de glucosa en sangre en ayunas normalizados con exendina-(9-39) en ratones *SUR-1^{-/-}*. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron después de 12-16 horas de ayuno el día 7. Ratones naturales de la misma camada tratados con vehículo (n = 13) (barra blanca); ratones naturales de la misma camada tratados

con exendina-(9-39) (n = 10) (barra rayada); ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con vehículo (n = 11) (barra negra); ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con exendina-(9-39) (n = 11) (barra gris);

La Figura 3 muestra el perfil hormonal en ayunas. (A) Niveles de glucagón y de insulina en ayunas en ratones naturales tratados con vehículo (n = 15) (barra blanca), ratones naturales tratados con exendina-(9-39) (n = 14) (barra rayada), ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con vehículo (n = 13) (barra negra), y ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con exendina-(9-39) (n = 14) (barra gris). (B) Relación de insulina a glucosa en ratones naturales tratados con vehículo (n = 9) (barra blanca), ratones naturales tratados con exendina-(9-39) (n = 10) (barra rayada), ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con vehículo (n = 9) (barra negra), y ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con exendina-(9-39) (n = 10) (barra gris);

La Figura 4 muestra que la exendina-(9-39) no influyó en la tolerancia a la glucosa ni en la sensibilidad a la insulina. (A) Tolerancia a la glucosa oral en ratones naturales de la misma camada tratados con vehículo (n = 10) (línea discontinua/cuadrados abiertos), ratones naturales tratados con exendina-(9-39) (n = 8) (línea continua/cuadrados sólidos), ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con vehículo (n = 9) (línea discontinua/círculos abiertos), y ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con exendina-(9-39) (n = 9) (línea continua/círculos sólidos). Ratones naturales tratados con vehículo frente a ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con vehículo, p = 0,001, ANOVA de medidas repetidas; ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con vehículo frente a ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con exendina-(9-39), p = 0,02 a los 120 min. (B) Sensibilidad a la insulina en ratones naturales tratados con vehículo (n = 15) (línea discontinua/cuadrados abiertos), ratones naturales tratados con exendina-(9-39) (n = 14) (línea continua/cuadrados sólidos), ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con vehículo (n = 13) (línea discontinua/círculos abiertos), y ratones *SUR-1^{-/-}* tratados con exendina-(9-39) (n = 14) (línea continua/círculos sólidos);

La Figura 5 muestra el efecto de la exendina-(9-39) sobre la sensibilidad al combustible de los islotes *SUR-1^{-/-}*. Los islotes aislados de ratones *SUR-1^{-/-}* se cultivaron durante 3 días en medio RPMI 1640 que contenía glucosa 10 mM. Se perfundieron lotes de 100 islotes cultivados con una rampa de una mezcla fisiológica de aminoácidos (0-12 mM) en presencia (círculos abiertos) o en ausencia (círculos negros) de exendina-(9-39) a una concentración 100 nM. Los resultados se presentan como las medias ± S.E. de 100 islotes procedentes de 3 perfusiones separadas para cada condición;

La Figura 6 muestra que la exendina-(9-39) no tuvo ningún impacto sobre el $[Ca^{2+}]_i$ en los islotes *SUR-1^{-/-}*. Los islotes de ratón *SUR-1^{-/-}* aislados se cultivaron con glucosa 10 mM durante 3 días sobre cubreobjetos. Se midió el $[Ca^{2+}]_i$ de forma continua mediante la fluorescencia de Fura-2 en respuesta a los aminoácidos (4 mM) en presencia (línea gris) o en ausencia (línea negra) de exendina-(9-39). Se muestran experimentos representativos. Todos los estudios se repitieron al menos 3 veces y mostraron resultados comparables; y

La Figura 7 muestra un esquema que describe el mecanismo de acción propuesto de la exendina-(9-39) en los islotes *SUR-1^{-/-}*. En los islotes de ratón *SUR-1^{-/-}*, la despolarización de la membrana plasmática da como resultado una elevación del Ca^{2+} citosólico y la desregulación de la secreción de insulina. La exendina-(9-39) se une al receptor de GLP-1 y disminuye los niveles basales de cAMP, lo que da como resultado la disminución de la secreción de insulina a pesar de los niveles elevados de calcio. De modo similar, al disminuir la acumulación de cAMP estimulada por aminoácidos, la exendina-(9-39) inhibe la secreción de insulina estimulada por aminoácidos.

Descripción detallada de la invención

Esta invención proporciona un antagonista del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) para uso en el tratamiento y mejora de hiperinsulinismo congénito y neonatal, en donde dicho antagonista del receptor de GLP-1 es el péptido, o un fragmento del péptido, presentado en la Secuencia ID No. 1.

En una realización, la presente invención proporciona un antagonista del receptor de GLP-1 para uso en el tratamiento de un sujeto con un hiperinsulinismo congénito, en donde dicho antagonista es el péptido, o un fragmento del péptido, presentado en la Secuencia ID No. 1.

En otra realización, la presente invención proporciona un antagonista del receptor de GLP-1 para uso en la reducción de una incidencia de hipoglucemia en un sujeto con hiperinsulinismo congénito, en donde dicho antagonista es el péptido, o un fragmento del péptido, presentado en la Secuencia ID No. 1.

En otra realización, la presente invención proporciona un antagonista del receptor de GLP-1 para uso en la mejora de un hiperinsulinismo congénito en un sujeto, en donde dicho antagonista es el péptido, o un fragmento del péptido, presentado en la Secuencia ID No. 1.

En otra realización, la presente invención proporciona un antagonista del receptor de GLP-1 para uso en la inhibición del desarrollo de hipoglucemia en un sujeto con hiperinsulinismo congénito, en donde dicho antagonista es el péptido, o un fragmento del péptido, presentado en la Secuencia ID No. 1.

En una realización, el antagonista del receptor de GLP-1 puede actuar aumentando los niveles de glucosa en sangre en ayunas y mejorando la tolerancia en ayunas en un sujeto con hiperinsulinismo congénito.

- 5 En una realización, una perfusión continua de exendina-(9-39) elevó los niveles de glucosa en sangre en ayunas en ratones normales, un efecto que ha sido observado en los babuinos y en los sujetos humanos sanos. Cuando se administra como una perfusión continua, en otra realización, la exendina-(9-39) aumenta significativamente los niveles de glucosa en sangre en ayunas en ratones portadores de una mutación completa en el SUR-1, sin afectar significativamente al aumento de peso, tolerancia a la glucosa o sensibilidad a la insulina. En otra realización, la relación elevada de insulina/glucosa se disminuye con la exendina-(9-39), lo que indica que en una realización, el efecto de la exendina-(9-39) está mediado por el receptor de GLP-1 en el islote sin tener ningún impacto significativo sobre otras acciones mediadas por el receptor de GLP-1 periférico o central.
- 10 En otra realización, la presente invención puede actuar disminuyendo la necesidad de glucosa para mantener la normoglucemia de un sujeto con hiperinsulinismo congénito, disminuyendo de este modo la necesidad de glucosa para mantener la euglucemia de un sujeto con hiperinsulinismo congénito.
- 15 En una realización, la exendina-(9-39) o sus fragmentos descritos en este documento, suprimen la secreción de insulina estimulada por aminoácidos. En otra realización la exendina-(9-39) o sus fragmentos descritos en este documento, bloquean la estimulación por nutrientes anormales de la secreción de insulina en ausencia de canales de K⁺ATP funcionales. En una realización, la exendina-(9-39) o sus fragmentos descritos en este documento, disminuyen la secreción de insulina basal y de insulina estimulada por aminoácidos y la acumulación de cAMP intracelular. En consecuencia, y en una realización, la exendina-(9-39) corrige el patrón anormal de secreción de insulina responsable de la hipoglucemia: la secreción de insulina basal elevada en ausencia de glucosa y la secreción de insulina estimulada por aminoácidos.
- 20 En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1 actúa suprimiendo la secreción de insulina por el sujeto.
- Como se indica en esta memoria, los pacientes con hiperinsulinismo HI K_{ATP} presentan hipoglucemia en respuesta a la proteína oral. Además, la exendina-(9-39) aumenta los niveles de glucosa en sangre en ayunas en ratones SUR-1^{-/-}. Por lo tanto, la presente invención demuestra que la exendina-(9-39) es eficaz en el tratamiento de hiperinsulinismo congénito.
- 25 En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1 se puede administrar después del diagnóstico de hiperinsulinismo congénito. En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1 se puede administrar después de la identificación de una anomalía genética que predispone al hiperinsulinismo congénito. En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1 se puede administrar a un sujeto con una historia familiar de hiperinsulinismo congénito. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 30 En una realización, el AMP cíclico estimula la exocitosis por rutas dependientes de PKA (proteína cinasa), a través de la fosforilación de dianas aguas abajo, incluyendo los canales de potasio sensibles a ATP (canal KATP), y por mecanismos independientes de PKA, a través de la activación de factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs), tales como cAMP-GEFII (también conocido como Epac). La ruta independiente de PKA es crítica en otra realización en la potenciación de la secreción de insulina por las hormonas incretinas GLP-1 y GIP y en una realización, ejerce su efecto sobre los gránulos secretores que contienen insulina situados en el conjunto fácilmente liberable. En los islotes pancreáticos, el efecto de cAMPGEFII sobre la secreción de insulina depende en una realización del calcio citosólico, así como del cAMP, y el cAMP sensibiliza en otra realización la maquinaria de exocitosis para el calcio. En una realización, la inhibición de la secreción de insulina en islotes SUR-1^{-/-} mediante la exendina-(9-39) o sus fragmentos descrita en este documento, está mediada por el efecto de cAMP sobre una etapa tardía dependiente de calcio en la ruta de exocitosis que implica el conjunto fácilmente liberable de gránulos de insulina (Figura 7).
- 35 40 La Figura 7 muestra un esquema que describe el mecanismo de acción propuesto de la exendina-(9-39) en los islotes SUR-1^{-/-}. En los islotes de ratón SUR-1^{-/-}, la despolarización de la membrana plasmática da como resultado una elevación del Ca²⁺ citosólico y la desregulación de la secreción de insulina. La exendina-(9-39) se une al receptor de GLP-1 y disminuye los niveles basales de cAMP, lo que da como resultado la disminución de la secreción de insulina a pesar de los niveles elevados de calcio. De modo similar, al disminuir la acumulación de cAMP estimulada por aminoácidos, la exendina-(9-39) inhibe la secreción de insulina estimulada por aminoácidos.
- 45 El hiperinsulinismo congénito tratado o mejorado por la presente invención, se asocia, en otra realización, con un aumento de la secreción de insulina por el sujeto. En otra realización, el hiperinsulinismo congénito se asocia con una anomalía genética. En otra realización, el hiperinsulinismo congénito se asocia con una mutación genética. En otra realización, el hiperinsulinismo congénito es el resultado de una anomalía genética. En otra realización, el hiperinsulinismo congénito es el resultado de una mutación genética. Cada posibilidad representa otra realización de la presente invención.
- 50 En otra realización, el hiperinsulinismo congénito se asocia con una disfunción del canal K-ATP. En otra realización, el hiperinsulinismo congénito es un hiperinsulinismo de tipo K_{ATP}.
- 55 En otra realización, el hiperinsulinismo congénito se asocia con una mutación en un gen que codifica un receptor de sulfonilurea (ABCC8). En otra realización, el hiperinsulinismo congénito se asocia con una mutación en un gen que

- codifica un canal de potasio rectificador de entrada, proteína Kir6.2 (*KGNJ11*). En otra realización, el hiperinsulinismo congénito se asocia con una mutación en un gen que codifica una glucocinasa (*GCK*). En otra realización, el hiperinsulinismo congénito se asocia con una mutación en un gen que codifica una glutamato deshidrogenasa (*GLUD-1*). En otra realización, el hiperinsulinismo congénito se asocia con una mutación en un gen que codifica una enzima mitocondrial 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (*HADHSC*). En otra realización, el hiperinsulinismo congénito se asocia con cualquier otra mutación conocida en la técnica que se asocie con un hiperinsulinismo congénito. Cada posibilidad representa otra realización de la presente invención.
- En otra realización, la presente invención proporciona un antagonista del receptor de GLP-1 para uso en el tratamiento de un sujeto con un hiperinsulinismo neonatal (HI), en donde dicho antagonista es el péptido, o un fragmento del péptido, presentado en la Secuencia ID No. 1.
- En otra realización, la presente invención proporciona un antagonista del receptor de GLP-1 para uso en la reducción de una incidencia de hipoglucemia en un sujeto con HI neonatal, en donde dicho antagonista es el péptido, o un fragmento del péptido, presentado en la Secuencia ID No. 1.
- El hiperinsulinismo neonatal (HI) tratado o mejorado por la presente invención, es, en otra realización, HI no genético. En otra realización, el HI neonatal es HI neonatal prolongado. En otra realización, el HI neonatal es HI neonatal prolongado no genético. En otra realización, el HI neonatal dura varios meses después del nacimiento. En otra realización, el HI neonatal es el resultado de estrés perinatal. En otra realización, el estrés perinatal es el resultado de bajo peso al nacer para la edad gestacional. En otra realización, el estrés perinatal es el resultado de asfixia al nacer. En otra realización, el estrés perinatal es el resultado de cualquier otro tipo de estrés perinatal conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1 utilizado en los usos y composiciones de la presente invención presenta una mejora en una propiedad biológica deseable en relación con el GLP-1. En otra realización, la propiedad biológica que se mejora es la semivida biológica. En otra realización, la propiedad biológica que se mejora es la afinidad por el receptor de GLP-1. En otra realización, la propiedad biológica que se mejora es la potencia del antagonismo del receptor de GLP-1. En otra realización, la propiedad biológica es cualquier otra propiedad biológica deseable conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1 comprende un grupo amida en su C-terminal (por ejemplo, el extremo de un péptido que normalmente contiene un grupo carboxi). En otra realización, el grupo amida confiere una mejora en una propiedad biológica deseable por el antagonista. En otra realización, la propiedad es la resistencia a la proteólisis. En otra realización, la propiedad biológica que se mejora es la semivida biológica. En otra realización, la propiedad biológica que se mejora es la afinidad por el receptor de GLP-1. En otra realización, la propiedad biológica que se mejora es la potencia del antagonismo del receptor de GLP-1. En otra realización, la propiedad biológica es cualquier otra propiedad biológica deseable conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- En esta invención, el antagonista es un péptido de exendina (9-39) (Ex9-39) (conocido también como "exendina-3"), cuyo péptido tiene una secuencia presentada en la SEQ ID No: 1. En otra realización, el antagonista es un fragmento del péptido presentado en la SEQ ID No. 1. En otra realización, el fragmento es un antagonista de un receptor de GLP-1. En otra realización, el fragmento presenta una semivida biológica prolongada en relación con el GLP-1. En otra realización, el fragmento es resistente a la escisión por DPPIV. En otra realización, el fragmento es resistente a la degradación por DPPIV. Cada posibilidad representa otra realización de la presente invención.
- El péptido exendina9-39 tiene la secuencia: DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID No: 1). En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1 es precursor de los antagonistas del receptor de GLP-1 anteriores. En otra realización, el precursor se metaboliza en el cuerpo del sujeto para generar el compuesto activo. En otra realización, el compuesto activo se genera a través de cualquier otro proceso conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- En otra realización, un antagonista del receptor de GLP-1 de los usos y composiciones de la presente invención es un compuesto mimético de Ex9-39. En otra realización, el compuesto mimético presenta resistencia a la proteasa en relación con el GLP-1. En otra realización, el compuesto mimético es resistente a la degradación por DPPIV. Cada posibilidad representa otra realización de la presente invención.
- En otra realización, un compuesto mimético de la presente invención se deriva de un péptido de exendina mediante la incorporación de 1 o más residuos de aminoácidos (AA) modificados. En otra realización, uno o más de los extremos terminales se derivatiza para incluir un grupo de bloqueo, esto es, un sustituyente químico adecuado para proteger y/o estabilizar los terminales N y C de una degradación indeseable. En otra realización, "degradación indeseable" se refiere a cualquier tipo de descomposición enzimática, química o bioquímica del compuesto en sus extremos terminales lo que es probable que afecte a la función del compuesto, esto es, la degradación secuencial del compuesto en un extremo terminal del mismo.

En otra realización, los grupos de bloqueo incluyen grupos protectores utilizados convencionalmente en la técnica de la química de péptidos que no afecten negativamente a las actividades *in vivo* del péptido. Por ejemplo, se pueden introducir grupos adecuados de bloqueo del N-terminal mediante alquilación o acilación del N-terminal. Los ejemplos de grupos adecuados de bloqueo del N-terminal incluyen grupos alquilo C₁-C₅ ramificados o no ramificados, grupos acilo tales como grupos formilo y acetilo, así como las formas sustituidas de los mismos, tal como el grupo acetamidometilo (Acm). Los análogos de desamino-aminoácidos son también grupos útiles de bloqueo del N-terminal, y pueden ser o bien acoplados al N-terminal del péptido o bien utilizados en lugar del residuo N-terminal. Los grupos adecuados de bloqueo de C-terminal, en los que el grupo carboxilo del C-terminal se incorpora o no, incluyen ésteres, cetonas o amidas. Son ejemplos de grupos de bloqueo del C-terminal los grupos alquilo que forman ésteres o cetonas, particularmente los grupos alquilo inferiores tales como metilo, etilo y propilo, y los grupos amino que forman amidas tales como aminas primarias (-NH₂), y los grupos mono- y di-alquil-amino tales como metilamino, etilamino, dimetilamino, dietilamino, metiletilamino y similares. Los análogos de aminoácidos descarboxilados tal como agmatina son también grupos útiles de bloqueo del C-terminal y pueden ser acoplados al residuo C-terminal del péptido o pueden ser utilizados en lugar del mismo. En otra realización, los grupos amino y carboxilo libres en los extremos terminales se separan totalmente del péptido para producir formas desaminadas y descarboxiladas del mismo sin afectar a la actividad del péptido.

En otra realización, un compuesto mimético de la presente invención se deriva de un péptido de exendina mediante otra modificación. En otra realización, dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la sustitución de 1 o más de los aminoácidos en la forma isomérica L natural con aminoácidos en la forma isomérica D. En otra realización, el péptido incluye uno o más residuos de D-aminoácidos, o comprende aminoácidos que están todos en la forma D. También se contemplan las formas retro-inversas de péptidos de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, péptidos invertidos en donde todos los aminoácidos están sustituidos con formas de D-aminoácidos.

En otra realización, los compuestos miméticos de la presente invención son sales de adición de ácido de un péptido de exendina. En otra realización, un péptido de exendina se trata con un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, y similares, o un ácido orgánico tal como ácido acético, propiónico, glicólico, pirúvico, oxálico, málico, malónico, succínico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, cinámico, mandélico, metanosulfónico, etanosulfónico, p-toluenosulfónico, salicílico y similares, para proporcionar una sal del péptido soluble en agua adecuada para uso en la invención.

En otra realización, un compuesto mimético de la presente invención se produce por un procedimiento que comprende la etapa de derivatización química *in vivo* o *in vitro* de un péptido de exendina, por ejemplo, acetilación, o carboxilación. También se incluyen modificaciones de glucosilación, por ejemplo, las realizadas modificando los patrones de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, exponiendo el polipéptido a enzimas que afectan la glucosilación, por ejemplo, enzimas de glucosilación o desglucosilación de mamíferos. En otra realización, un compuesto mimético de la presente invención comprende un residuo de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina, o fosfotreonina.

En otra realización, un compuesto mimético de la presente invención se produce mediante la modificación de un péptido de exendina utilizando técnicas biológicas moleculares ordinarias con el fin de mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o de optimizar las propiedades de solubilidad. En otra realización, un péptido de exendina se modifica para hacerlo más adecuado como agente terapéutico. Los análogos de dichos polipéptidos incluyen los que contienen residuos distintos de los L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos que no están presentes en la naturaleza. Los péptidos de la invención no se limitan a los productos de cualquiera de los procedimientos específicos a modo de ejemplo listados en el presente documento.

Los métodos de identificación de compuestos miméticos son bien conocidos en la técnica, y están descritos, por ejemplo, en Song J *et al*, *Biochem Cell Biol* 76 (2-3): 177-188, 1998; Vogt A *et al*, *J Biol Chem*. 270 (2): 660-4, 1995; Alexopoulos K *et al*, *J Med Chem* 47 (13): 3338-52, 2004; Andronati SA *et al*, *Curr Med Chem* 11 (9): 1183-211, 2004; Breslin MJ *et al*, *Bioorg Med Chem Lett* 13 (10): 1809-1812, 2003; y en el documento WO 02/081649 ("ErbB interface peptidomimetics and methods of use thereof") a nombre de Greene *et al*. En otra realización, la construcción del modelo se utiliza para diseñar los compuestos miméticos como se describe en una de las referencias anteriores. En otra realización, la solubilidad de los compuestos miméticos se optimiza como se describe en una de las referencias anteriores. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, el sujeto de los usos y composiciones de la presente invención es un sujeto humano. En otra realización, el sujeto es un sujeto pediátrico. En otra realización, el sujeto es un niño. En otra realización, el sujeto es un joven. En otra realización, el sujeto es un recién nacido. En otra realización, el sujeto es un lactante. En otra realización, el sujeto es un adolescente. En otra realización, el sujeto es un adulto. En otra realización, el sujeto es cualquier otro tipo de sujeto conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, el sujeto es menor de 10 años de edad. En otra realización, es menor de 9 años de edad. En otra realización, es menor de 8 años de edad. En otra realización, es menor de 7 años de edad. En otra realización, es menor de 6 años de edad. En otra realización, es menor de 5 años de edad. En otra realización, es menor de 4 años de edad. En otra realización, es menor de 3 años de edad. En otra realización, es menor de 2 años de edad.

- 5 En otra realización, es menor de 18 meses de edad. En otra realización, es menor de 1 año de edad. En otra realización, es menor de 10 meses de edad. En otra realización, es menor de 8 meses de edad. En otra realización, es menor de 6 meses de edad. En otra realización, es menor de 4 meses de edad. En otra realización, es menor de 3 meses de edad. En otra realización, es menor de 2 meses de edad. En otra realización, es menor de 1 mes de edad.
- 10 En otra realización, el sujeto es mayor de 6 meses de edad. En otra realización, es mayor de 1 año de edad. En otra realización, es mayor de 2 años de edad. En otra realización, es mayor de 3 años de edad. En otra realización, es mayor de 5 años de edad. En otra realización, es mayor de 7 años de edad. En otra realización, es mayor de 10 años de edad. En otra realización, es mayor de 15 años de edad. En otra realización, es mayor de 20 años de edad. En otra realización, es mayor de 30 años de edad. En otra realización, es mayor de 40 años de edad. En otra realización, es mayor de 50 años de edad. En otra realización, es mayor de 60 años de edad. En otra realización, es mayor de 65 años de edad. En otra realización, es mayor de 70 años de edad.
- 15 En otra realización, la edad del sujeto es de 1 mes a 5 años. En otra realización, la edad es de 2 meses a 5 años. En otra realización, la edad es de 3 meses a 5 años. En otra realización, la edad es de 4 meses a 5 años. En otra realización, la edad es de 6 meses a 5 años. En otra realización, la edad es de 9 meses a 5 años. En otra realización, la edad es de 1-5 años. En otra realización, la edad es de 2-5 años. En otra realización, la edad es de 3-5 años. En otra realización, la edad es 1-10 años. En otra realización, la edad es de 1-5 años. En otra realización, la edad es de 2-10 años. En otra realización, la edad es de 3-10 años. En otra realización, la edad es de 5-10 años. En otra realización, la edad es de 1-6 meses. En otra realización, la edad es de 2-6 meses. En otra realización, la edad es de 3-12 meses. En otra realización, la edad es de 6-12 meses.
- 20 Cada edad y cada intervalo de edad representan una realización separada de la presente invención.
- En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1 de la presente invención se puede administrar por perfusión. En otra realización, el método de administración comprende una bomba.
- 25 Las composiciones farmacéuticas que contienen el antagonista del receptor de GLP-1 pueden ser administradas a un sujeto, en otra realización, por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, tal como por vía parenteral, transmucosal, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intra-ventricular, intra-craneal, intra-vaginal o intra-turnoral.
- 30 En otra realización de los usos y composiciones de la presente invención, las composiciones farmacéuticas son para ser administradas oralmente, y se formulan por lo tanto en una forma adecuada para la administración oral, esto es, como una preparación sólida o líquida. Las formulaciones orales sólidas adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, pelets y similares. Las formulaciones orales líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra realización de la presente invención, el ingrediente activo se formula en una cápsula. De acuerdo con esta realización, las composiciones de la presente invención comprenden, además del compuesto activo y el vehículo o diluyente inerte, una cápsula de gelatina dura.
- 35 En otra realización, las composiciones farmacéuticas son para la administración por inyección intravenosa, intraarterial, o intramuscular de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para administración intravenosa. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intraarterial y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para administración intraarterial. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intramuscular y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para administración intramuscular.
- 40 En otra realización, las composiciones farmacéuticas son para ser administradas tópicamente a las superficies corporales y por lo tanto se formulan en una forma adecuada para administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen geles, pomadas, cremas, lociones, gotas y similares. Para la administración tópica, el antagonista del receptor de GLP-1 o sus derivados fisiológicamente tolerados tales como sales, ésteres, N-óxidos, y similares se preparan y se aplican como soluciones, suspensiones, o emulsiones en un diluyente fisiológicamente aceptable con o sin un vehículo farmacéutico.
- 45 En otra realización, la composición farmacéutica es para ser administrada como un supositorio, por ejemplo un supositorio rectal o un supositorio uretral. En otra realización, la composición farmacéutica se administra por implantación subcutánea de un pelet. En otra realización, el pelet proporciona la liberación controlada del antagonista del receptor de GLP-1 durante un período de tiempo.
- 50 En otra realización, el compuesto activo se administra en una vesícula, por ejemplo un liposoma.
- 55 En otras realizaciones, los vehículos o diluyentes usados en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, una goma, un almidón (por ejemplo almidón de maíz, almidón pregelatinizado), un azúcar (por ejemplo, lactosa, manitol,

sacarosa, dextrosa), un material celulósico (por ejemplo celulosa microcristalina), un acrilato (por ejemplo polimetilacrilato), carbonato de calcio, óxido de magnesio, talco, o mezclas de los mismos.

5 En otras realizaciones, los vehículos farmacéuticamente aceptables para formulaciones líquidas son soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones o aceites. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Son ejemplos de aceites los de origen animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, otros aceites marinos, o un lípido de la leche o de los huevos.

10 En otra realización, los vehículos parenterales (para inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial, o intramuscular) incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactada y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos tales como los basados en la dextrosa de Ringer, y similares. Son ejemplos los líquidos estériles tales como agua y aceites, con o sin la adición de un tensioactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En
15 general, el agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionados, y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol son los vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. Son ejemplos de aceites los de origen animal, vegetal, o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, otros aceites marinos, o un lípido de la leche o de los huevos.

20 En otras realizaciones, las composiciones comprenden además aglutinantes (por ejemplo goma arábica, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, povidona), agentes disgregantes (por ejemplo almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa de sodio, crospovidona, goma guar, almidón-glicolato sódico), tampones (por ejemplo, Tris-HCl., acetato, fosfato) de diferentes pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción a
25 superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), inhibidores de la proteasa, tensioactivos (por ejemplo laurilsulfato de sodio), potenciadores de la permeación, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, hidroxianisol butilado), estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa), agentes para aumentar la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos),
30 lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, laurilsulfato de sodio), ayudantes de fluidez (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo ftalato de dietilo, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo carbómero, hidroxipropilcelulosa, laurilsulfato de sodio), recubrimientos poliméricos (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formadores de película (por ejemplo, etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes. Cada uno de los excipientes anteriores representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento son composiciones de liberación controlada, esto es, composiciones en las que el antagonista del receptor de GLP-1 se libera durante un período de tiempo después de la administración. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen la
40 formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo ácidos grasos, ceras, aceites). En otra realización, la composición es una composición de liberación inmediata, esto es, una composición en la que todo el antagonista del receptor de GLP-1 se libera inmediatamente después de la administración.

En otra realización, la composición farmacéutica se administra en un sistema de liberación controlada. En otra
45 realización, el agente se administra utilizando perfusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas, u otros modos de administración. En otra realización, se utiliza una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, CRC Crit Ref Biomed Eng 14: 201 (1987); Buchwald *et al*, Surgery 88: 507 (1980); Saudek *et al.*, N. Engl J. Med 321: 574 (1989). En otra realización, se utilizan materiales poliméricos; por ejemplo, en microesferas o en un implante. En otra realización más, se coloca un sistema de liberación controlada en la proximidad de la diana terapéutica, necesitando de este modo sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en
50 Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol 2, pp 115-138 (1984); y Langer R, Science 249: 1527-1533 (1990).

Las composiciones incluyen también, en otra realización, la incorporación del material activo en o sobre preparaciones en forma de partículas de compuestos poliméricos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas
55 de eritrocitos, o esferoplastos). Tales composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo*, y velocidad de aclaramiento *in vivo*.

Se incluyen también en la presente invención composiciones en forma de partículas recubiertas con polímeros (por ejemplo poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado a anticuerpos que se dirigen contra receptores, ligandos o antígenos específicos de tejido o acoplado a ligandos de receptores específicos de tejido.

También están comprendidos en la invención los compuestos modificados por la unión covalente de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina. Los compuestos modificados son conocidos por presentar semividas en sangre sustancialmente más largas después de inyección intravenosa que las de los correspondientes compuestos no modificados (Abuchowski *et al.*, 1981; Newmark. *et al.*, 1982, y Katre *et al.*, 1987). Tales modificaciones aumentan también, en otra realización, la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminan la agregación, mejoran la estabilidad física y química del compuesto, y reducen en gran medida la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. En otra realización, la actividad biológica *in vivo* deseada se logra mediante la administración de dichos aductos de compuesto-polímero menos frecuentemente o en dosis más bajas que con el compuesto sin modificar.

La preparación de composiciones farmacéuticas que contienen un componente activo, por ejemplo mediante mezclado, granulación, o procesos de formación de comprimidos, es bien conocida en la técnica. El ingrediente terapéutico activo se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Para la administración oral, el antagonista del receptor de GLP-1 o sus derivados fisiológicamente tolerados tales como sales, ésteres, N-óxidos, y similares se mezclan con aditivos habituales para este fin, tales como vehículos, estabilizantes, o diluyentes inertes, y se convierten por métodos usuales en formas adecuadas para la administración, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina dura o blanda, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas. Para la administración parenteral, el antagonista del receptor de GLP-1 o sus derivados fisiológicamente tolerados tales como sales, ésteres, N-óxidos, y similares, se convierten en una solución, suspensión o emulsión, si se desea con las sustancias habituales y adecuadas para este fin, por ejemplo, solubilizantes u otras sustancias.

Un componente activo se formula en la composición, en otra realización, como formas de sales neutralizadas farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la molécula de polipéptido o anticuerpo), que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas a partir de los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, y similares.

En otra realización, la dosis del antagonista del receptor de GLP-1 es 1 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 2 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 3 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 5 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 7 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 10 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 12 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 15 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 20 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 25 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 30 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 50 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 70 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 100 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 120 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 150 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 200 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 250 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 300 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 400 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 500 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 700 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1000 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1200 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1500 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es más de 1500 pmol/kg/min.

En otra realización, la dosis es 30-500 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1-2 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1-3 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1-5 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1-10 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1-20 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1-40 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1-60 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1-100 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1-200 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 1-300 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 2-5 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 2-10 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 2-20 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 2-40 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 2-70 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 2-100 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 2-200 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 2-300 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 5-10 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 5-20 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 5-40 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 5-70 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 5-100 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 5-200 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 5-300 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 10-20 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 10-40 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 10-70 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 10-100 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 10-150 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 10-200 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 10-300 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 10-500 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 20-40 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 20-70 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 20-100 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 20-150 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 20-200 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 20-300 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 20-500 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 30-40 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 30-70 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 30-100 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 30-150 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 30-200 pmol/kg/min. En otra realización,

la dosis es 30-300 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 30-500 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 50-100 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 50-150 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 50-200 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 50-300 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 50-500 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 100-150 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 100-200 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 100-300 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 100-500 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 100-1000 pmol/kg/min. En otra realización, la dosis es 100-1500 pmol/kg/min.

En otra realización, la dosis es 20 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 25 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 30 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 40 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 60 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 80 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 100 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 150 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 200 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 300 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 400 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 600 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 800 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 1000 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 1200 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 1500 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 2000 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es más de 2000 nmol/kg/día.

En otra realización, la dosis es 20-2000 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 20-700 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 20-100 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 20-200 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 20-300 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 20-500 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 20-1000 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 40-100 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 40-200 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 40-300 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 40-500 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 40-1000 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 60-100 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 60-150 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 60-200 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 60-300 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 60-500 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 100-200 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 100-300 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 100-500 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 100-1000 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 100-1500 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 200-300 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 200-500 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 200-1000 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 200-1500 nmol/kg/día.

Cada dosis y cada intervalo de dosis representan una realización separada de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición para uso en el tratamiento de hiperinsulinismo congénito, comprendiendo la composición un receptor de GLP-1 de la presente invención.

En otra realización de la presente invención, "ácidos nucleicos" o "nucleótido" se refiere a una cadena de al menos dos combinaciones de base-azúcar-fosfato. El término incluye, en una realización, el DNA y el RNA. "Nucleótidos" se refiere, en una realización, a las unidades monoméricas de polímeros de ácido nucleico. El RNA está, en una realización, en la forma de un tRNA (RNA de transferencia), snRNA (RNA nuclear pequeño), rRNA (RNA ribosómico), mRNA (RNA mensajero), RNA antisentido, RNA inhibidor pequeño (siRNA), micro RNA (miRNA) y ribozimas. El uso de siRNA y miRNA ha sido descrito (Caudy AA *et al*, Genes & Devel 16: 2491-96 y referencias citadas en el documento). El DNA puede estar, en otras realizaciones, en forma de DNA plásmido, DNA vírico, DNA lineal, o DNA cromosómico o derivados de estos grupos. Además, estas formas de DNA y RNA pueden ser de cadena simple, doble, triple, o cuádruple. El término incluye también, en otra realización, ácidos nucleicos artificiales que contienen otros tipos de cadenas principales, pero las mismas bases. En una realización, el ácido nucleico artificial es un PNA (ácido nucleico peptídico). Los PNA contienen cadenas principales peptídicas y bases de nucleótidos y son capaces de unirse, en una realización, tanto a moléculas de DNA como de RNA. En otra realización, el nucleótido es oxetano modificado. En otra realización, el nucleótido es modificado por el reemplazamiento de uno o más enlaces fosfodiéster por un enlace fosforotioato. En otra realización, el ácido nucleico artificial contiene cualquier otra variante de la cadena principal de fosfato de los ácidos nucleicos nativos conocidos en la técnica. El uso de ácidos nucleicos con fosforotioato y PNA es conocido por los expertos en la técnica, y está descrito, por ejemplo, en PE Neilsen, Curr Opin Struct Biol 9: 353-57; y Raz NK *et al* Biochem Biophys Res Commun. 297: 1075-84. La producción y el uso de los ácidos nucleicos es conocido por los expertos en la técnica y está descrito, por ejemplo, en Molecular Cloning, (2001), Sambrook and Russell, eds. y Methods in Enzymology: Methods for molecular cloning in eukaryotic cells (2003) Purchio and GC Fareed. Cada derivado de ácido nucleico representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona una molécula quimérica, que comprende la fusión de exendina o un péptido GLP con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo etiqueta se coloca, en otras realizaciones, en el extremo amino o carboxilo terminal de la proteína o en una localización interna de la misma. Se detecta la presencia de tales formas etiquetadas de epítopos de exendina o péptidos GLP, en otra realización, utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. En otra realización, la inclusión del epítipo etiqueta permite que la exendina o péptido GLP se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta epítipo. Varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos son conocidos

en la técnica. Los ejemplos incluyen poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field *et al*, Mol Cell Biol, 8: 2159-2165 (1988)); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 contra la misma (Evan *et al*, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)); y la etiqueta de la glucoproteína D (gD) del virus de Herpes Simplex y su anticuerpo (Paborsky *et al*, Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)). Otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido Flag (Hopp *et al*, Biotechnology, 6: 1204-1210 (1988)); el péptido epítipo KT3 (Martin *et al*, Science, 255: 192-194 (1992)); un péptido epítipo de la tubulina (Skinner *et al*, J. Biol Chem, 266: 15163 a 15166 (1991)); y el péptido etiqueta de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth *et al*, Proc Natl Acad Sci USA, 87: 6393-6397 (1990)). En otra realización, la molécula quimérica comprende la fusión de la exendina o péptido GLP con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Los métodos para construir proteínas de fusión son bien conocidos en la técnica, y están descritos, por ejemplo, en LaRoche *et al*, J. Cell Biol, 139 (2): 357-66 (1995); Heidar *et al*, FASEB J., 9 (1): 140-5 (1995); Ashkenazi *et al*, Int. Rev. Immunol., 10 (2-3): 219-27 (1993) y Cheon *et al*, PNAS USA, 91 (3): 989-93 (1994).

En otra realización, la presente invención proporciona un kit que comprende un compuesto o composición utilizado para llevar a cabo un método de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona un kit que comprende una composición, aparato o instrumento de la presente invención. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En una realización, el término "administración" se refiere a un método de poner en contacto, que puede ser directo o indirecto. En un método dicho contacto comprende la inyección directa de la célula diana a través de cualquier medio bien conocido en la técnica, tal como la microinyección. En otra realización, el suministro a la célula es indirecto, tal como a través de la disposición en un medio de cultivo que rodea a la célula, o la administración a un sujeto, o a través de cualquier vía conocida en la técnica. En otra realización, el término significa que el antagonista del receptor de GLP-1 de la presente invención se introduce en un sujeto que recibe el tratamiento, y se deja que el compuesto entre en contacto con el antagonista del receptor de GLP-1 *in vivo*. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

"Administración", en una realización, se refiere a poner en contacto directamente la célula diana con una composición de la presente invención. En otra realización, "poner en contacto" se refiere a poner en contacto indirectamente la célula diana, con una composición de la presente invención. En otra realización, los métodos de la presente invención incluyen métodos en los que el sujeto se pone en contacto con un antagonista del receptor de GLP-1 que es puesto en contacto con la célula diana mediante difusión o cualquier otro procedimiento de transporte activo o transporte pasivo conocido en la técnica mediante el cual los compuestos circulan dentro del cuerpo. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización de los métodos de la presente invención, el antagonista del receptor de GLP-1 se transporta en el torrente sanguíneo del sujeto hasta la célula diana del sujeto. En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1 se transporta por difusión hasta la célula diana del sujeto. En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1 se transporta por transporte activo hasta la célula diana del sujeto. En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1 se administra al sujeto de tal manera que se pone directamente en contacto con la célula diana del sujeto. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

El tejido diana de los métodos y composiciones de la presente invención es, en otra realización, el islote pancreático. En otra realización, el tejido diana es el hipotálamo. En otra realización, el tejido diana es el hipocampo. En otra realización, el tejido diana es la corteza cerebral. En otra realización, el tejido diana es el riñón. En otra realización, el tejido diana es el corazón. En otra realización, el tejido diana es el tracto gastrointestinal. En otra realización, el tejido diana es cualquier otro tejido diana conocido en la técnica que expresa un receptor de GLP-1. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización de los métodos y composiciones de la presente invención, el antagonista del receptor de GLP-1 se administra en combinación con un fármaco utilizado para tratar uno de los trastornos anteriores. En otra realización, el fármaco es diazóxido. En otra realización, el fármaco es octreotida. En otra realización, el fármaco es cualquier otro fármaco conocido en la técnica que puede ser utilizado para tratar un hiperinsulinismo. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

Cada uno de los aditivos, excipientes, formulaciones y métodos de administración anteriores representa una realización separada de la presente invención.

Detalles de la sección experimental

Materiales y métodos

Animales

Los ratones *SUR-1^{-/-}* fueron proporcionados amablemente por el doctor Mark A. Magnuson. La generación y genotipado de los ratones *SUR-1^{-/-}* se ha descrito previamente (8). Los ratones se mantienen en un fondo genético

C57BL/6. Se utilizaron en todos los experimentos ratones SUR-1^{-/-} de doce a dieciocho semanas y ratones control naturales de la misma camada. Se mantuvieron los ratones en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h y fueron alimentados con una dieta estándar de pienso para roedores. Todos los procedimientos fueron aprobados y realizados de acuerdo con las directrices del Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal de la Universidad de Pensilvania.

Administración de exendina-(9-39)

Se implantaron subcutáneamente mini-bombas osmóticas Alzet (modelo 2002; Alza, Palo Alto, CA) para administrar exendina-(9-39) (Bachem Bioscience, King of Prussia, PA) a una velocidad de 150 pmol/kg/min o vehículo (NaCl al 0,9 % /BSA al 1 %) durante 2 semanas.

Homeostasis de la glucosa

Para la determinación de los niveles de glucosa en sangre en ayunas se dejaron los ratones en ayunas durante 12-16 horas. Se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa oral después de un ayuno de 12-16 horas administrando 2 g/kg de dextrosa por sonda oral (agujas de alimentación; Popper and Sons, Inc., Hyde Park, NY). Para el ensayo de tolerancia a la insulina los ratones recibieron 0,5 unidades/kg de insulina por vía intraperitoneal después de un ayuno de 4 horas. Se midieron los niveles de glucosa en sangre utilizando un medidor de glucosa manual (FreeStyle; TheraSense, Alameda, CA). La insulina y el glucagón se midieron por ELISA (Mouse Endocrine Immunoassay Panel; Linco Research, Inc., St. Charles, MO).

Estudios de los islotes

Se aislaron los islotes por digestión con colagenasa y se cultivaron durante 3 días en medio RPMI 1640 que contenía glucosa 10 mM. El medio de cultivo se suplementó con 10 % de suero fetal bovino, glutamina 2 mM, 100 unidades/mL de penicilina, y 50 µg/mL de estreptomycin. Se incubaron los islotes a 37 °C en un incubador con 5 % de CO₂ y 95 % de aire humidificado. Se cargaron lotes de 100 islotes de ratón cultivados a un filtro de nilón en una cámara y se perfundieron con tampón Krebs-Ringer-bicarbonato (NaCl 115 mM, NaHCO₃ 24 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2,5 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4) con 0,25 % de seroalbúmina bovina a un caudal de 2 mL/min. Las soluciones perfundidas se gasearon con 95 % de O₂ y 5 % de CO₂ y se mantuvieron a 37 °C. Se estimularon los islotes con una rampa de aminoácidos. La mezcla fisiológica de 19 aminoácidos cuando se utilizó a una concentración máxima 12 mM (aproximadamente 3 veces la concentración fisiológica) tenía la siguiente composición (en mM): glutamina 2, alanina 1,25, arginina 0,53, aspartato 0,11, citrulina 0,27, glutamato 0,35, glicina 0,85, histidina 0,22, isoleucina 0,27, leucina 0,46, lisina 1,06, metionina 0,14, ornitina 0,20, fenilalanina 0,23, prolina 1, serina 1,62, treonina 0,77, triptófano 0,21, valina 0,57. Se recogieron muestras cada minuto para ensayos de insulina. Se midió la insulina por radioinmunoensayo (Linco Research Inc., St. Charles, MO).

Determinación del contenido de cAMP

Se aislaron los islotes como anteriormente, se escogieron a mano y se cultivaron durante tres días. Se preincubaron los islotes cultivados en tampón Krebs-Ringer-bicarbonato exento de glucosa durante 60 minutos, se añadió exendina-(9-39) 100 nM durante 30 min en el periodo de preincubación. Después, se expusieron los islotes a diferentes tratamientos durante 30 minutos adicionales en presencia de isobutil-metilxantina 0,1 mM (IBMX). Después de la incubación, se lavaron los islotes 2 veces con tampón de Hank frío exento de glucosa. Se midió el cAMP en lisados de los islotes mediante ELISA (GE/Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Medidas de Ca²⁺ citosólico libre

Se aislaron islotes de ratón y se cultivaron en cubreobjetos de vidrio recubiertos de poli-lisina en las mismas condiciones que se han descrito antes. El procedimiento de perfusión y la medida de Ca²⁺ citosólico libre ([Ca²⁺]_i) se han descrito previamente (24). En resumen, el cubreobjetos con los islotes unidos se incubó con Fura-2 acetoximetiléster 15 µM (Molecular Probes, Eugene, OR) en tampón Krebs-Ringer-bicarbonato con glucosa 5 mM durante 35 minutos a 37 °C. Se perfundieron después los islotes con tampón Krebs-Ringer-bicarbonato con 0,25 % de seroalbúmina bovina a 37 °C a un caudal de 2 mL/min, mientras se aplicaron diferentes agentes. Se midió el [Ca²⁺]_i con un microscopio de fluorescencia de longitud de onda dual como se ha descrito antes.

Evaluación estadística

Los datos presentados son la media ± SEM (error estándar de la media) y se compararon utilizando la prueba t de Student. Para el ensayo de glucosa y de tolerancia a la insulina, se compararon los valores mediante ANOVA de medidas repetidas. Las diferencias se consideraron significativas a p < 0,05.

Ejemplo 1: la exendina-(9-39) aumenta significativamente los niveles de glucosa en sangre en ayunas en ratones SUR-1^{-/-}

Se sometieron ratones SUR-1^{-/-} machos de 12-18 semanas de edad y sus compañeros naturales de camada a una evaluación básica incluyendo las medidas de glucosa en sangre en ayunas y el ensayo de tolerancia a la glucosa

oral, seguido por la asignación aleatoria al tratamiento con exendina-(9-39) (150 pmol/kg/min) o con vehículo (NaCl al 0,9 %, BSA al 1 %). Se determinaron los niveles de glucosa en sangre en ayunas después del ayuno nocturno los días 3 y 7 de la perfusión. En adición, se evaluaron durante el tratamiento la tolerancia a la glucosa oral y la sensibilidad a la insulina. Los niveles de glucosa en sangre en ayunas fueron significativamente más bajos en los ratones SUR-1^{-/-} en comparación con los ratones naturales de la misma camada (59,4 ± 1,5 mg/dL frente a 75 ± 1,8 mg/dL, p = 0,0000003) (Figura 1A), mientras que el peso corporal no fue diferente (Figura 1B). Después de una carga oral de glucosa, los ratones SUR-1^{-/-} fueron intolerantes a la glucosa en comparación con los controles naturales de la misma camada (p < 0,0001, ANOVA de medidas repetidas) (Figura 1C). Los ratones SUR-1^{-/-} tienen un deterioro significativo de la secreción de insulina en respuesta a una carga de glucosa oral (naturales frente a SUR-1^{-/-}: p = 0,02, ANOVA de medidas repetidas) (Figura 1D). Se administró exendina-(9-39) mediante una mini-bomba osmótica Azlet subcutánea a una velocidad de perfusión continua de 150 pmol/kg/min durante 2 semanas. Se eligió esta dosis en base a los resultados de un estudio piloto de evaluación de diferentes dosis que previamente habían demostrado tener un efecto en los seres humanos y en los ratones normales.

El día 7, la glucosa en sangre en ayunas fue significativamente más baja en los ratones SUR-1^{-/-} tratados con vehículo en comparación con sus compañeros de camada naturales tratados con vehículo (p = 0,000002) (Figura 2). El tratamiento con exendina-(9-39) aumentó significativamente los niveles de glucosa en sangre en ayunas en los ratones SUR-1^{-/-} en comparación con los ratones SUR-1^{-/-} tratados con vehículo (82,2 ± 6,3 mg/dL frente a 63,2 ± 4,9 mg/dL, p = 0,03, el día 3; 82 ± 4,7 mg/dL frente a 56,4 ± 4,3 mg/dL, p = 0,0006, el día 7). Los niveles de glucosa en sangre en ayunas no fueron diferentes en los ratones naturales tratados con exendina-(9-39) en comparación con los controles naturales tratados con vehículo, en contraste con nuestras observaciones anteriores en los ratones naturales BALB/c, lo que sugiere un papel específico de la cepa del receptor de GLP-1 en la glucemia en ayunas. La exendina-(9-39) no afectó al aumento de peso en los SUR-1^{-/-} ni en los controles naturales de la misma camada.

Ejemplo 2: La exendina-(9-39) afecta directamente a la secreción de insulina de los islotes

Durante el tratamiento, los niveles de insulina y de glucagón en ayunas no fueron diferentes entre los grupos de tratamiento (Figura 3A); sin embargo, en el ajuste de los niveles más bajos de glucosa en sangre en ayunas, los niveles de insulina fueron anormalmente elevados en los ratones SUR-1^{-/-} tratados con vehículo y los niveles de glucagón no subieron tanto como se esperaba en respuesta a la hipoglucemia. La relación insulina/glucosa se aumenta en los ratones SUR-1^{-/-} en comparación con los ratones controles naturales de la misma camada (Figura 3B) (naturales frente a SUR-1^{-/-}: p = 0,04) y se normaliza por tratamiento con exendina-(9-39) (naturales frente a SUR-1^{-/-} Ex (9-39): p = 0,32), lo que sugiere un efecto directo de la exendina-(9-39) sobre la secreción de insulina en los islotes.

Dados los efectos observados *in vivo* sobre la secreción de insulina, pero no sobre la sensibilidad a la insulina, se determinó a continuación si la exendina-(9-39) ejercía un efecto directo sobre la función de los islotes SUR-1^{-/-}. Se realizó el examen del efecto de la exendina-(9-39) sobre la respuesta anormal de los islotes SUR-1^{-/-} a la secreción de insulina inducida por combustible (específicamente, la hiperreactividad a los aminoácidos). Los islotes aislados se perfundieron con una mezcla de aminoácidos. Los islotes SUR-1^{-/-} liberaron anormalmente insulina en respuesta a la estimulación en rampa por una mezcla fisiológica de 19 aminoácidos (utilizando un incremento de 0,04 mM/min para glutamina y 0,2 mM/min para los otros aminoácidos). Esta respuesta a los aminoácidos fue bloqueada por la exendina-(9-39) (Figura 5). La respuesta de insulina al KCl fue similar en presencia y ausencia de exendina-(9-39).

Ejemplo 3: La exendina-(9-39) no altera la tolerancia a la glucosa ni la sensibilidad a la insulina en ratones SUR-1^{-/-}

A pesar del marcado efecto sobre los niveles de glucosa en sangre en ayunas, el tratamiento con exendina-(9-39) no deterioró de forma significativa la tolerancia a la glucosa en los ratones SUR-1^{-/-}, a excepción de un pequeño retraso en el retorno a los valores basales de los niveles de glucosa en sangre a los 120 minutos. Similarmente, no hubo ningún efecto sobre la tolerancia a la glucosa en los compañeros de camada naturales durante el tratamiento con exendina-(9-39) (Figura 4A).

Para determinar el mecanismo de acción para el efecto de la exendina-(9-39) sobre los niveles de glucosa en sangre en ayunas, se evaluó la sensibilidad a la insulina mediante un ensayo de tolerancia a la insulina. La sensibilidad a la insulina no fue diferente entre los ratones SUR-1^{-/-} y los ratones naturales de la misma camada y la exendina-(9-39) no tuvo impacto sobre la sensibilidad periférica a la insulina en ninguno de los grupos de tratamiento (Figura 4B).

Ejemplo 4: Los efectos de la exendina-(9-39) sobre la secreción de insulina en islotes SUR-1^{-/-} están mediados por cambios en cAMP

El efecto de la exendina-(9-39) sobre el cAMP se determinó en incubaciones estáticas de islotes aislados. En ausencia de GLP-1 exógeno, la exendina-(9-39) redujo significativamente el cAMP intracelular basal en los islotes SUR-1^{-/-} (40,1 ± 4,2 frente a 20,5 ± 2,3 pmol/100 islotes, p < 0,05) (Tabla 1). El aumento de cAMP estimulado por aminoácidos se redujo de manera similar por la exendina-(9-39) (52,5 ± 9,4 frente a 20,9 ± 4,4 pmol/100 islotes, p < 0,05). En estas incubaciones estáticas, el efecto de la exendina-(9-39) sobre los niveles de cAMP reflejó el efecto sobre la secreción de insulina, lo que sugiere que los efectos de la exendina-(9-39) sobre la secreción de insulina en islotes SUR-1^{-/-} están mediados por los cambios del cAMP. La secreción de insulina basal fue reducida

significativamente por la exendina-(9-39) (221 ± 22 frente a 126 ± 12 ng/100 islotes/30 min, $p < 0,05$). Similarmente, la exendina-(9-39) redujo significativamente la secreción de insulina estimulada por aminoácidos (389 ± 17 frente a 219 ± 14 ng/100 islotes/30 min, $p < 0,01$).

5 Tabla 1. La exendina-(9-39) reduce el contenido de cAMP citosólico basal y estimulado y la liberación de insulina en islotes SUR-1^{-/-}

Condición	Contenido de cAMP (pmol/100 islotes)	Secreción de insulina (ng/100 islotes/30 min)
Basal	$40,1 \pm 4,2$	221 ± 22
Exendina-(9-39)100 nM	$20,5 \pm 2,3^a$	$1,26 \pm 12^a$
AAM 4 nM	$20,9 \pm 4,4^a$	389 ± 17^{bd}
Exendina-(9-39) 100 nM/ AAM 4 nM	$52,5 \pm 9,4^c$	219 ± 14

10 Se cultivaron islotes aislados de ratón SUR-1^{-/-} en glucosa 10 mM durante 3 días. Los islotes se incubaron previamente en KRBB exento de glucosa durante 60 min. Se añadió exendina-(9-39) 100 nM después de 30 minutos de preincubación. Después se expusieron los islotes a diferentes condiciones de tratamiento durante 30 min adicionales. En comparación con la condición basal, a: $p < 0,05$, b: $p < 0,01$. En comparación con exendina-9 100 nM/ AAM 4 mM, c: $p < 0,05$, d: $p < 0,01$.

Ejemplo 5: El efecto de la exendina-(9-39) sobre la secreción de insulina es independiente del calcio

15 Se estudió el efecto de la exendina-(9-39) sobre la concentración de calcio intracelular característicamente elevada de los islotes SUR-1^{-/-}. La exendina-(9-39) no afectó al calcio intracelular basal (Figura 6). Como se ha informado anteriormente, los aminoácidos causaron un aumento adicional transitorio en el calcio intracelular. La exendina-(9-39) no tuvo ningún efecto sobre el aumento del calcio intracelular estimulado por aminoácidos, lo que indica que su efecto sobre la secreción de insulina es independiente del calcio.

Una vez descritas las realizaciones preferidas de la invención con referencia a los dibujos y ejemplos que las acompañan, se debe entender que la invención no se limita a las realizaciones precisas, sino que es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

20

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista del receptor del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) para uso en el tratamiento de un hiperinsulinismo congénito, la reducción de una incidencia de un hiperinsulinismo congénito,
- 5 el tratamiento de un hiperinsulinismo neonatal (HI), o la reducción de una incidencia de hipoglucemia en un sujeto con HI neonatal, en donde dicho antagonista es el péptido, o un fragmento del péptido, presentado en la Secuencia ID No. 1.
2. Un antagonista del receptor del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) para uso según la reivindicación 1, en el tratamiento de un hiperinsulinismo congénito.
- 10 3. Un antagonista para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho hiperinsulinismo congénito se asocia o con una anomalía o mutación genética, o con una mutación en un gen que codifica un receptor de sulfonilurea (SUR-1), o con una mutación en un gen que codifica una proteína Kir6.2, o con una mutación en un gen que codifica una proteína seleccionada entre glucocinasa (GCK), glutamato deshidrogenasa (GLUD-1), y la enzima mitocondrial 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (HADHSC).
- 15 4. Un antagonista del receptor del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) para uso según la reivindicación 1, en la reducción de una incidencia de un hiperinsulinismo congénito.
5. Un antagonista para uso según la reivindicación 4, en donde dicho hiperinsulinismo congénito se asocia o con una anomalía o mutación genética, o con una mutación en un gen que codifica un receptor de sulfonilurea (SUR-1), o con una mutación en un gen que codifica una proteína Kir6.2, o con una mutación en un gen que codifica una proteína seleccionada entre glucocinasa (GCK), glutamato deshidrogenasa (GLUD-1), y la enzima mitocondrial 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (HADHSC).
- 20 6. Un antagonista del receptor del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) para uso según la reivindicación 1, en el tratamiento de un HI neonatal.
7. Un antagonista para uso según la reivindicación 6, en donde dicho HI neonatal es un HI neonatal prolongado.
- 25 8. Un antagonista para uso según la reivindicación 6, en donde dicho HI neonatal se asocia con un estrés perinatal.
9. Un antagonista para uso según la reivindicación 8, en donde dicho estrés perinatal es un bajo peso al nacer para la edad gestacional o una asfixia al nacer.
10. Un antagonista del receptor del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) para uso según la reivindicación 1, en la reducción de una incidencia de hipoglucemia en un sujeto con HI neonatal.
- 30 11. Un antagonista para uso según la reivindicación 10, en donde dicho HI neonatal es un HI neonatal prolongado.
12. Un antagonista para uso según la reivindicación 10, en donde dicho HI neonatal se asocia con un estrés perinatal.
13. Un antagonista para uso según la reivindicación 12, en donde dicho estrés perinatal es un bajo peso al nacer para la edad gestacional o una asfixia al nacer.

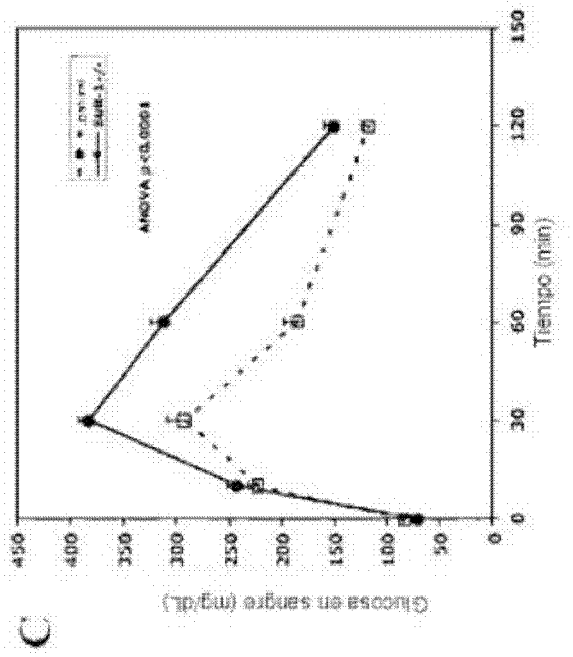
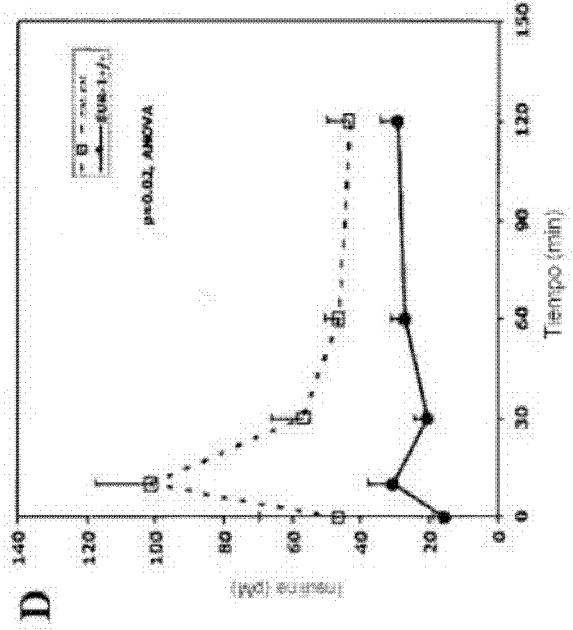
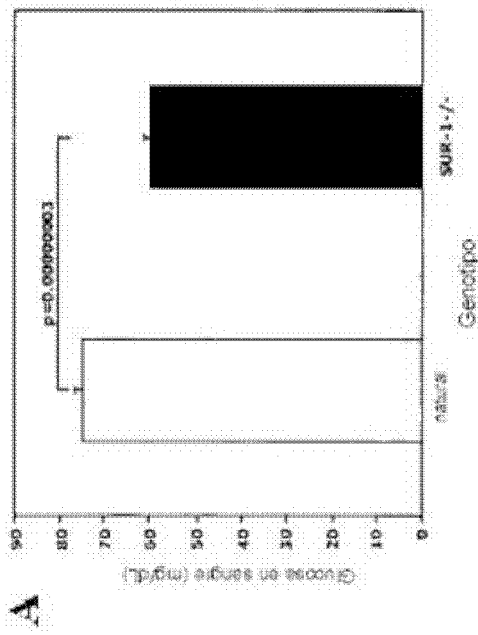
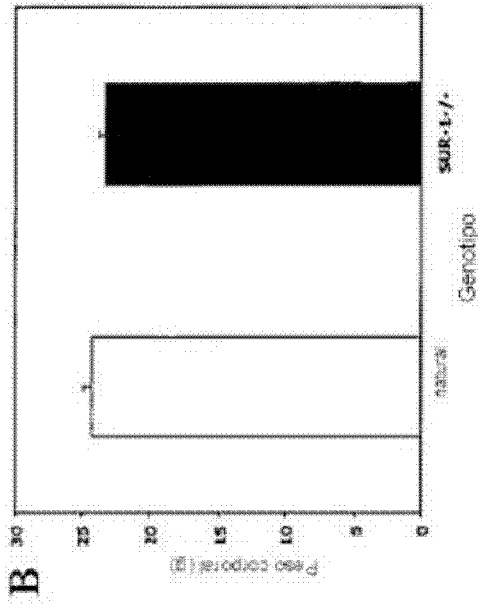


Figura 1

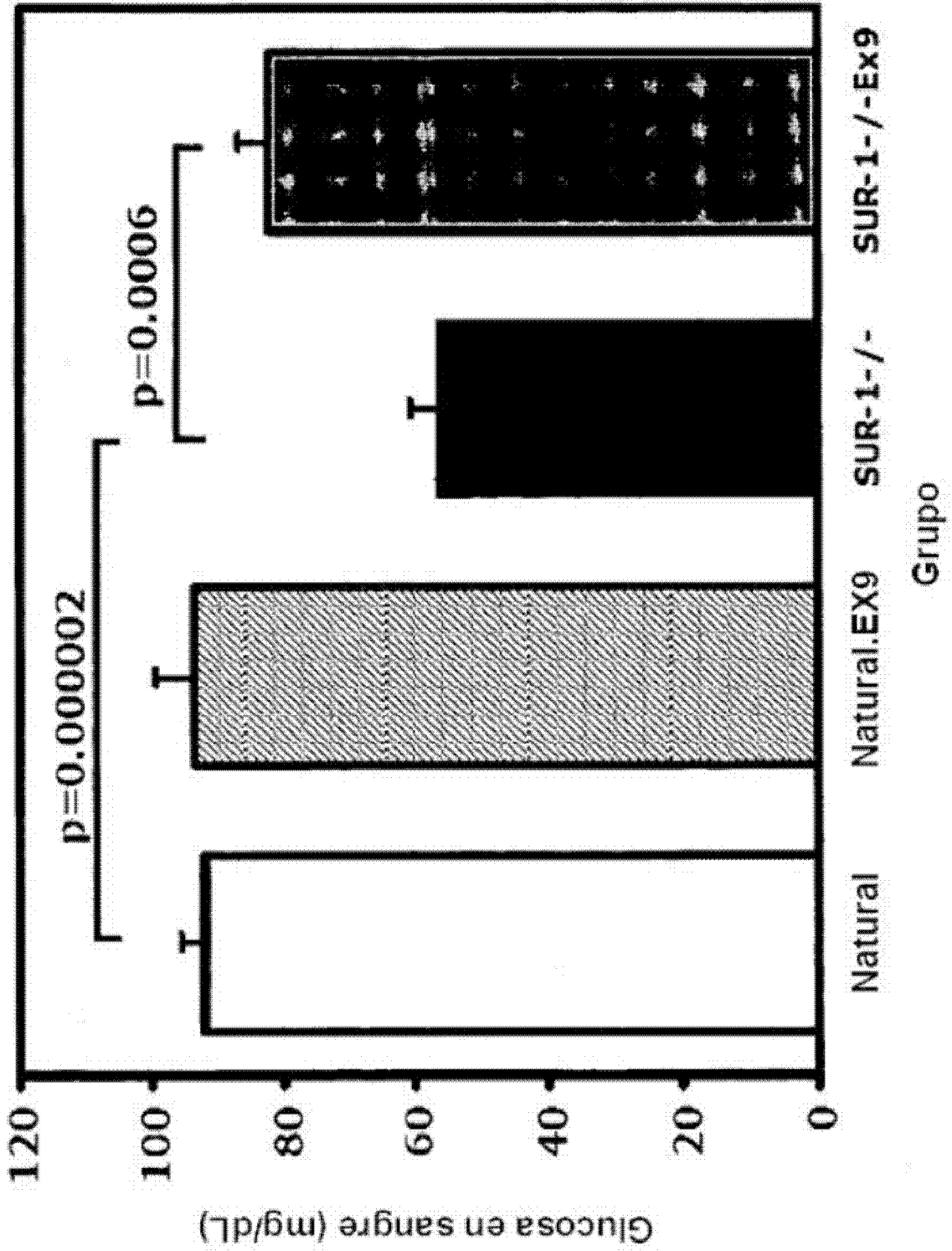


Figura 2

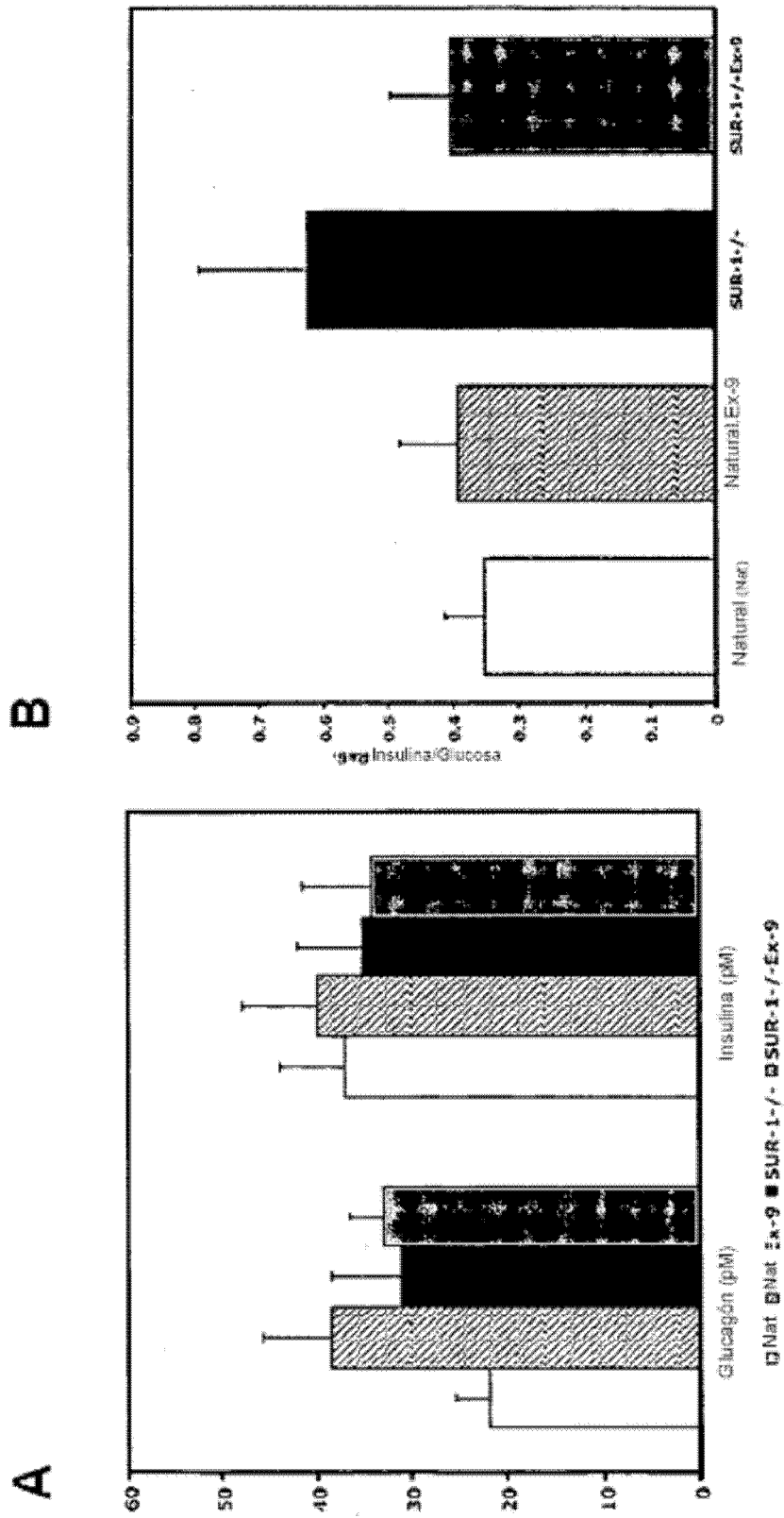


Figura 3

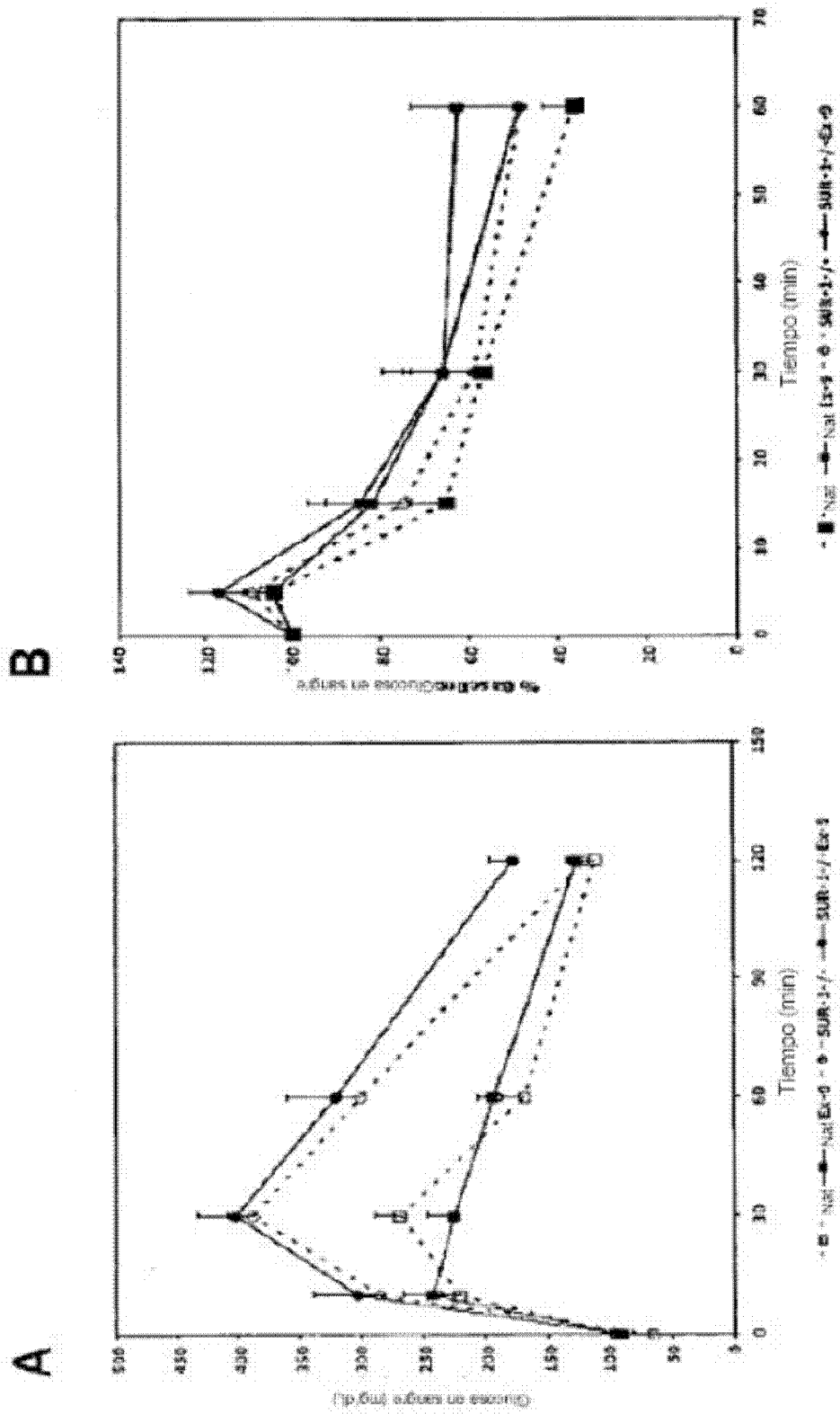


Figura 4

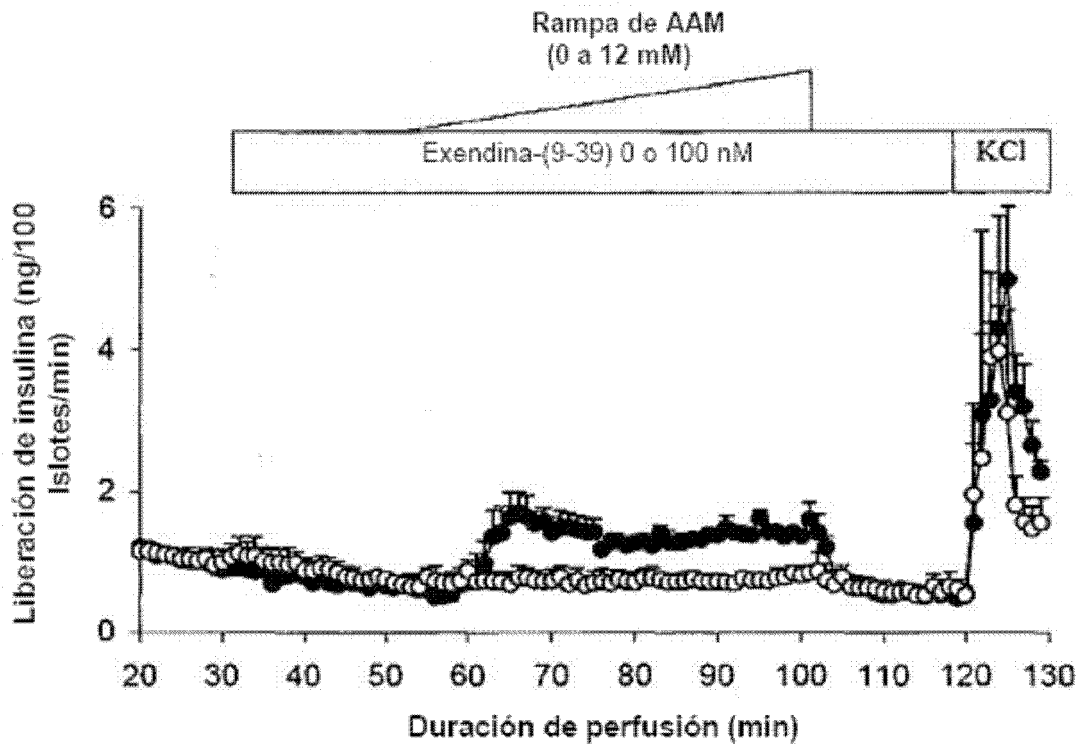


Figura 5

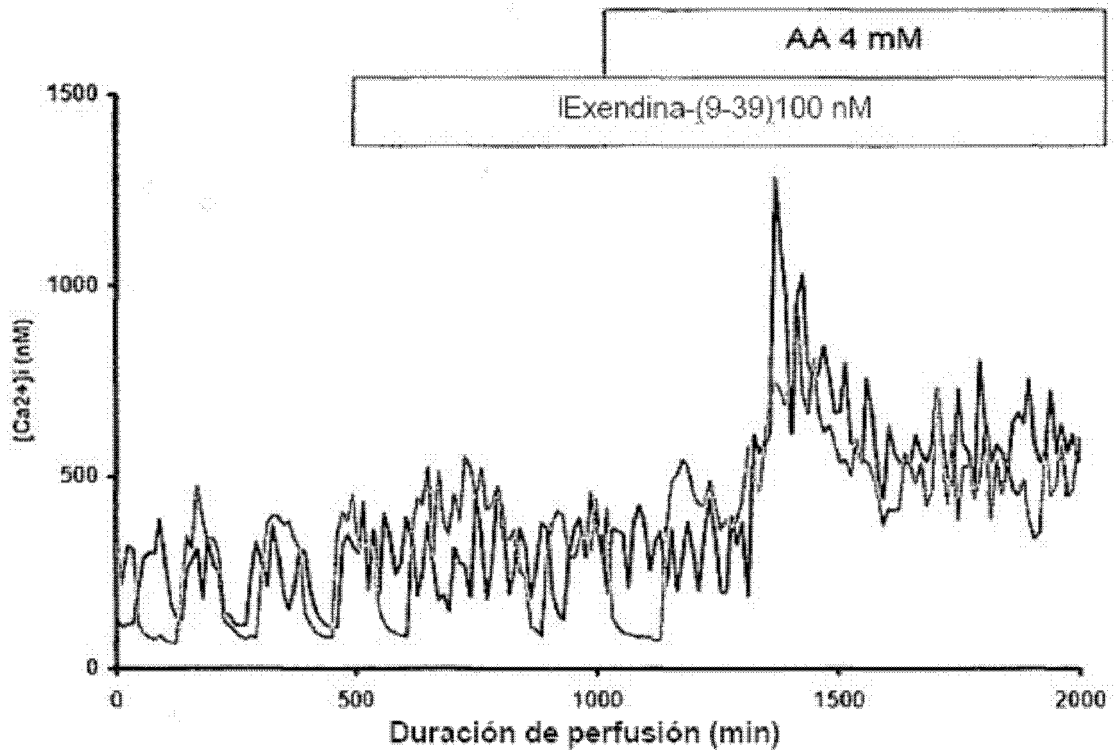


Figura 6

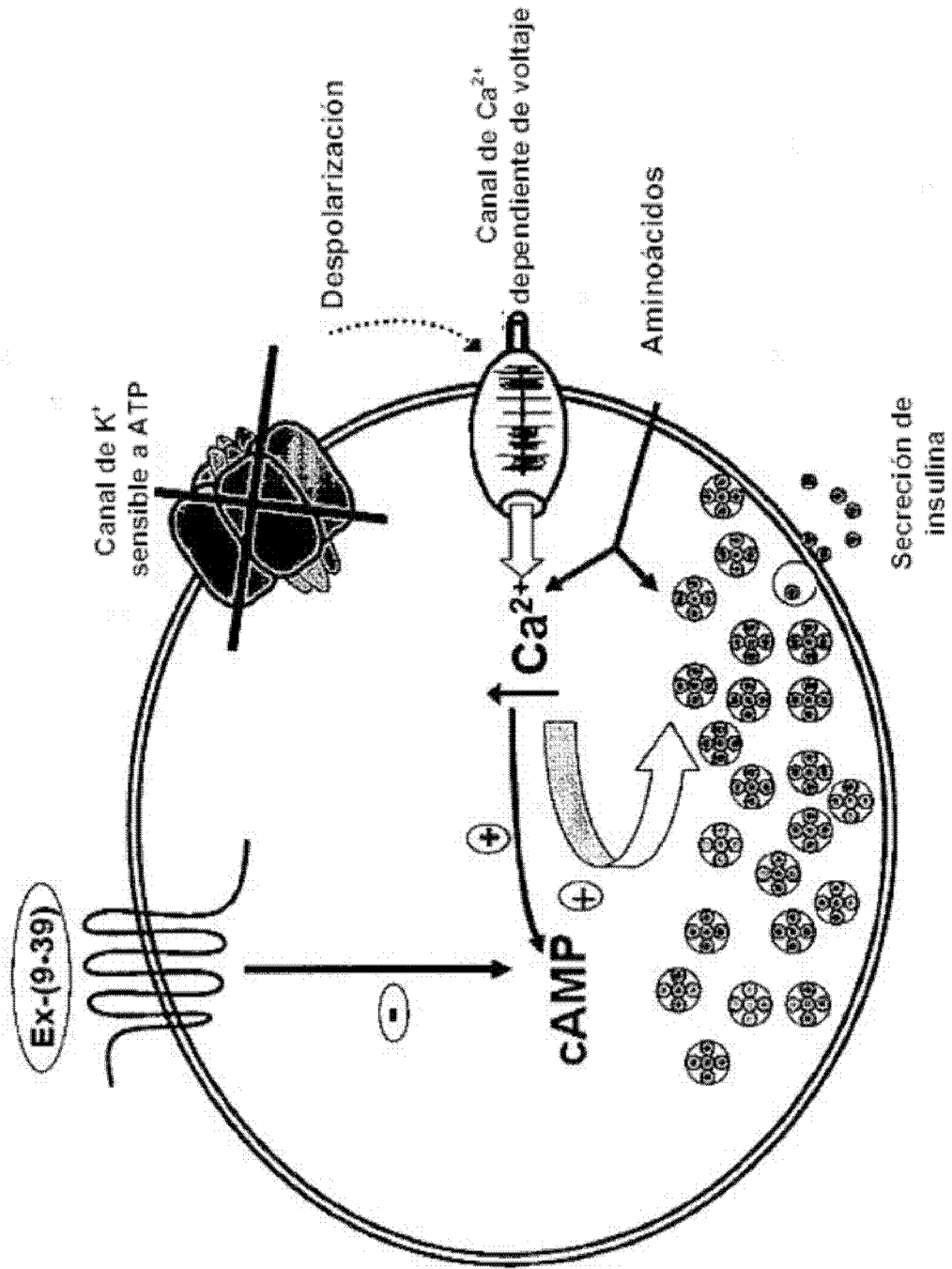


Figura 7