

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 523**

51 Int. Cl.:

C07K 14/63 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2010 PCT/JP2010/062746**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.02.2011 WO11013728**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2010 E 10804474 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2460826**

54 Título: **Compuesto peptídico de tipo motilina que tiene una susceptibilidad de absorción transmucosa impartida al mismo**

30 Prioridad:

29.07.2009 JP 2009177107

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

07.02.2018

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi- Honcho
Chuo-ku, Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

**SATO, SEIJI;
HANADA, TAKESHI;
WAKABAYASHI, NAOMI;
MASUDA, YUTAKA y
HARADA, YURIKO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 653 523 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

Compuesto peptídico de tipo motilina que tiene una susceptibilidad de absorción transmucosa impartida al mismo

5 La presente divulgación se refiere a compuestos peptídicos de tipo motilina que tienen una mayor actividad sobre la estimulación de la motilidad gastrointestinal y una mayor susceptibilidad de absorción tras una administración transmucosa tales que son útiles en el tratamiento de afecciones caracterizadas por anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal, tales como dispepsia funcional, gastroparesia diabética, enfermedad por reflujo gastroesofágico, síndrome de intestino irritable, proliferación de pequeñas bacterias intestinales, pseudo-obstrucción del colon, íleo paralítico, pseudo-obstrucción intestinal idiopática crónica e íleo postoperatorio.

10 La motilina es un péptido fisiológicamente activo de 22 aminoácidos aislado a partir del músculo liso abdominal, y su estructura se identificó por primera vez en 1973 mediante el aislamiento de la motilina porcina (Documentos no Patente 1 y 2). En 1995 se aisló la motilina humana y se identificó que tenía la misma estructura que la motilina porcina (Documento no Patente 3).

15 Se sabe que la motilina tiene una función fisiológica que está asociada con el complejo migratorio interdigestivo (en lo sucesivo abreviado en el presente documento como CMI) que se produce en un estado de ayunas. El CMI es una función fisiológica mediante la cual el contenido del tracto gastrointestinal, tal como el epitelio y la membrana mucosa que han sido desprendidos de su pared interna, así como los fluidos secretados a partir de la misma, son forzados para que fluyan hacia abajo a su parte inferior, limpiando así su interior. En las personas sanas, la motilina es secretada desde el duodeno y el yeyuno a unos intervalos de aproximadamente 100 min en un estado de ayunas, produciéndose el CMI con un aumento en el nivel plasmático de motilina (Documento no Patente 4); el CMI es inducido cuando se administra motilina a un perro, a un mono o a un ser humano (Documentos no Patente, 5, 6 y 7); la aparición fisiológica del CMI es suprimida mediante la administración de suero anti-motilina; en vista de estos y de otros hallazgos, se sostiene que las funciones gastrointestinales, tales como la digestión de los alimentos y la secreción de los jugos digestivos, son mantenidas normalmente como resultado de la secreción de motilina que induce el CMI, permitiendo que los desechos sean eliminados del tracto gastrointestinal (Documento no Patente 8).

20 Con respecto a las relaciones entre la anomalía en el CMI y una enfermedad, se ha notificado que cuando se reduce el CMI, los desechos del tracto gastrointestinal se acumulan en el tracto intestinal provocando un crecimiento anormal de las bacterias intestinales, por lo que las bacterias intestinales producen endotoxinas que inducen afecciones gastrointestinales tales como una evolución excesiva de gas, meteorismo abdominal, diarrea y dolor abdominal (Documento no Patente 9). Particularmente en las enfermedades que están asociadas con anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal, tales como dispepsia funcional, íleo postoperatorio y pseudo-obstrucción intestinal idiopática crónica, se ha notificado que la aparición del CMI se reduce o no se observa en absoluto (Documento no Patente 13) y que una disminución en la secreción de motilina endógena *in vivo* o una disminución en la acción de la motilina está relacionada con anomalías o con una reducción en las funciones de motilidad gastrointestinal (Documento no Patente 14). El síndrome de intestino irritable es un trastorno intestinal crónico que, en ausencia de cualquier enfermedad subyacente tal como inflamaciones y tumores, pero debido a las anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal inferior, normalmente el intestino grueso, provoca molestias abdominales crónicas ejemplificadas por dolor abdominal y meteorismo abdominal o anomalías en el movimiento del intestino, tales como estreñimiento y diarrea. Se ha notificado que en al menos algunos de los pacientes que han desarrollado un síndrome de intestino irritable, la flora intestinal estaba alterada causando un cambio en las especies bacterianas, un crecimiento bacteriano anormal, etc. (Documento no Patente 9) y la acumulación de los desechos gastrointestinales en el tracto intestinal, por lo tanto una reducida aparición del CMI puede ser una causa del cambio en la flora intestinal.

25 Los fármacos de primera elección disponibles actualmente frente a las enfermedades asociadas con las anteriormente mencionadas anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal son medicinas para uso interno para mejorar la función de la motilidad gastrointestinal, ejemplificadas por antagonistas del receptor de la dopamina, agonistas selectivos del receptor de la serotonina 5-HT₄ y agentes estimulantes parasimpáticos. De hecho, hay algunos casos en los que el tratamiento con estos fármacos terapéuticos mostró una mejora temporal de los síntomas, pero en muchos otros casos no se observó ningún efecto terapéutico, y los doctores y los pacientes solo obtienen una pequeña satisfacción con esas medicinas internas usadas para mejorar la motilidad gastrointestinal. Por lo tanto, se desea fuertemente proporcionar productos terapéuticos basados en un nuevo mecanismo de acción y se espera que den lugar a una mejora en los síntomas o a una curación de la enfermedad mediante la administración externa de agonistas del receptor de la motilina a pacientes con anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal, de forma que se normalicen sus funciones gastrointestinales.

30 Desde el momento en el que se notificó que la eritromicina y sus compuestos relacionados tenían actividad como agonistas de la motilina, se han llevado a cabo ensayos clínicos con agonistas de la motilina de bajo peso molecular en pacientes con anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal (Documentos no Patente 19 y 20), y también hay una pluralidad de dichos agonistas de la motilina de bajo peso molecular que fueron sometidos a ensayos clínicos en forma de fármacos orales (Documentos no Patente 21 y 22). Sin embargo, por una u otra razón, tal como el desarrollo de efectos secundarios que no tienen nada que ver con la acción como agonistas de la motilina (es

decir, una inhibición del HERG, defectos espermatogénicos y efectos carcinógenos) o la atenuación de la eficacia del fármaco debido a la administración repetida, se ha suspendido el desarrollo de productos farmacéuticos que contienen los agonistas de la motilina como principio activo, y ninguno de ellos se ha comercializado hasta la fecha como una medicina para mejorar las funciones gastrointestinales.

5 También se han llevado a cabo ensayos clínicos con pacientes con anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal, usando motilina nativa o agonistas peptídicos de la motilina como compuestos peptídicos (Documentos no Patente 15 y 16). Sin embargo, la única vía de administración que se ha notificado alguna vez en relación con los ensayos clínicos y los experimentos con animales usando estos compuestos peptídicos es la intravenosa, y debido a la dificultad de realizar una administración repetida y prolongada a los pacientes, la eficacia terapéutica de los compuestos todavía no se ha verificado.

15 Algunos ejemplos de compuestos peptídicos de tipo motilina que se han desarrollado hasta ahora son atilmotin de Baxter (Documento Patente 1) y SK-896 de SANWA KAGAKU (Documento Patente 2). El primero es un compuesto creado con objeto de mejorar la semivida *in vivo* y mediante un experimento metabólico usando un sobrenadante homogeneizado de riñón, que se concibe como un órgano primario para el metabolismo de la motilina (Documento no Patente 17), se ha verificado que el compuesto tiene una mejor estabilidad metabólica (Documento Patente 1) y su semivida en plasma es de aproximadamente 10 minutos, aproximadamente tres veces la de la motilina (Documento no Patente 18). El último es un compuesto diseñado para realizar una producción más eficaz. Ambos compuestos mantienen una actividad de mejora de la motilidad gastrointestinal comparable a la de la motilina. Sin embargo, como en el caso de la motilina, la vía de administración de estos compuestos está limitada a la intravenosa, y cada compuesto tiene el problema de que su uso está limitado al tratamiento en instalaciones médicas, donde no puede ser usado durante un largo periodo de tiempo. Por lo tanto, no se ha conseguido el descubrimiento de ningún fármaco que se base en la acción inherente de la motilina, es decir, que mantenga las funciones gastrointestinales de una forma normal mediante la eliminación de los desechos del interior del tracto gastrointestinal, con el resultado de que la eficacia terapéutica de cualquiera de los compuestos todavía no se ha verificado.

30 Se ha desarrollado un péptido que tiene una sustitución de leucina por metionina en la posición 13 de la motilina (Documento Patente 3). Sin embargo, la actividad biológica de este péptido es comparable a la de la motilina y su vía de administración está limitada a la intravenosa, dejando así todavía sin resolver el problema de la imposibilidad de un uso prolongado. Una preparación absorbible de motilina que contiene una sustancia activa de tipo motilina y un agente tensioactivo, en el que la sustancia activa preferida es L-leucina-13-motilina-homoserina, se ha divulgado en el Documento Patente 4. Los polipéptidos de tipo motilina también se divulgan en el Documento Patente 5.

35 En vista de lo anterior, se desea que, con objeto de desarrollar un nuevo fármaco terapéutico basado en la acción inherente de la motilina, debería proporcionarse un agonista peptídico de la motilina como un agente farmacéutico que pueda ser administrado durante un periodo de tiempo prolongado a través de una vía no invasiva.

40 Lista de citas

Referencia patente

45 Documento Patente 1: JP Hei 7-70178 A
Documento Patente 2: JP Hei 7-42319 B
Documento Patente 3: JP Sho 52-46068 A
Documento Patente 4: EP 0 507 573 A2
Documento Patente 5: EP 0 378 078 A1

50 Referencia no patente

Documento no Patente 1: Brown J et al., Can J Biochem, 51,533 (1973)
Documento no Patente 2: Schubert H et al., Can J Biochem, 52, 7 (1974)
Documento no Patente 3: De Clercq et al., Regul Pept, 55, 79 (1995)
55 Documento no Patente 4: Itoh, Nishshoushi (Journal of the Japanese Society of Gastroenterology) 93, 517 (1996)
Documento no Patente 5: Nakaya M et al., Peptides, 4, 439 (1983)
Documento no Patente 6: Yogo K et al., Dig Dis Sci, 52, 3112 (2007)
Documento no Patente 7: Haans J et al., Neurogastroenterol Motil, 18, 637 (2006)
Documento no Patente 8: Kusano et al, MB Gastro, 1,47 (1991)
60 Documento no Patente 9: Pimentel M et al., Dig Dis Sci, 47, 2639 (2002)
Documento no Patente 10: Pardo A et al., Hepatology 31, 858 (2000)
Documento no Patente 11: Castiglione F et al., Aliment Pharmacol Ther. 18, 1107 (2003)
Documento no Patente 12: Henry C. Lin, JAMA. 292, 852 (2004)
Documento no Patente 13: Labo Get al., Gastroenterology, 90, 20 (1986)
65 Documento no Patente 14: Kusano M et al., Am J Gastroenterol, 92, 481 (1997)
Documento no Patente 15: Kamerling I et al., Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 284, G776 (2003)

Documento no Patente 16: Park M-I et al., Neurogastroenterol Motilo, 18, 28 (2006)
 Documento no Patente 17: Jenssen TG et al., Scy J Gastroenterol, 19, 717 (1984)
 Documento no Patente 18: Peeters TL et al., Neurogastroenterol Motil, 18, 1 (2006)
 Documento no Patente 19: Janssens J et al., N Engl J Mend, 322, 1028 (1990)
 Documento no Patente 20: Stacher G et al., Gut, 34, 166 (1993)
 Documento no Patente 21: Choi MG et al., J Pharmacol Exp Ther, 285, 37 (1998)
 Documento no Patente 22: Netzer P et al., Aliment Pharmacol Ther, 16, 1481 (2002)

Un problema de la presente invención es proporcionar compuestos peptídicos de tipo motilina que mantengan la actividad estimulante de la motilidad gastrointestinal de la motilina nativa y que estén adaptados para tener una mayor susceptibilidad de absorción tras una administración transmucosa.

Para resolver este problema, los presentes inventores asumieron en primer lugar que la motilina podría ser degradada después de una administración transmucosa no invasiva, y llevaron a cabo un experimento de degradación de la motilina usando un sobrenadante de homogeneizado pulmonar. Como resultado se averiguó que la motilina era degradada, y mediante la identificación del producto de degradación, se estimó que la ruta de degradación de la motilina era tal que su C terminal experimentaría una degradación por parte de la dicarboxi peptidasa.

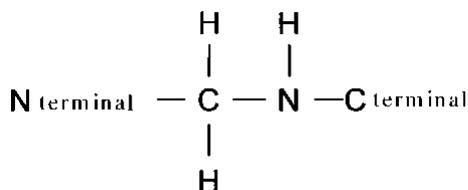
Tomando como base estos resultados, los presentes inventores sustituyeron la prolina por glicina en la posición 21 de la motilina, de forma que la degradación mediada por la dicarboxi peptidasa del C terminal sería inhibida para producir compuestos peptídicos de tipo motilina que mostraran una mayor susceptibilidad de absorción tras su administración transmucosa, lo que dio lugar a la consecución de la presente divulgación. Además, dado que se averiguó que el lado N terminal de la fenilalanina experimentaba una degradación, se demostró que la sustitución del enlace amida entre el primer y el segundo aminoácido del N terminal por un enlace no peptídico, un enlace -psi[CH₂NH]-, también contribuiría a una mejora adicional en la estabilidad metabólica.

(i) Específicamente, la presente invención ha revelado que el problema establecido anteriormente puede abordarse mediante la preparación de compuestos peptídicos que mantengan una actividad estimulante de la motilidad gastrointestinal comparable a la de la motilina nativa y que todavía tengan una mayor susceptibilidad de absorción tras una administración transmucosa, siendo dichos compuestos unos compuestos que comprenden la secuencia representada por la siguiente fórmula 1, que está caracterizada por una sustitución con prolina en la posición de aminoácido 21^a:

X1 Val X2 Ile Phe Thr Tyr Gly X3 Leu Gln Arg X4 Gln Glu Lys Glu Arg X5 Lys Pro Gln (fórmula 1) SEQ ID NO: 2

[en la que todos los enlaces entre aminoácidos, distintos al enlace X1-Val, son enlaces amida;

X1 es fenilalanina, β-homofenilglicina o acetilnaftilalanina;
 el enlace X1-Val es un enlace amida o un enlace representado por la siguiente fórmula 2



(fórmula 2)

X2 es prolina o sarcosina;
 X3 es ácido glutámico o ácido aspártico;
 X4 es metionina o leucina;
 X5 es asparragina o prolina]

o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

La presente invención engloba adicionalmente lo siguiente:

(ii) Un compuesto según (i), que está representado por la secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 3 hasta 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(iii) Un compuesto según (i), que está representado por la SEQ ID NO: 4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(iv) Un compuesto según (i), que está representado por la SEQ ID NO: 6 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(v) Un compuesto según (i), que está representado por la SEQ ID NO: 8 o una sal farmacéuticamente aceptable

del mismo.

(vi) Una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada con una anomalía funcional en el tracto gastrointestinal, que comprende el compuesto peptídico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según se menciona en uno cualquiera de (i) hasta (v).

(vii) La composición farmacéutica según se menciona en (vi) en la que la enfermedad asociada con una anomalía funcional en el tracto gastrointestinal es dispepsia funcional, gastroparesia diabética, enfermedad por reflujo gastroesofágico, síndrome de intestino irritable, proliferación de pequeñas bacterias intestinales, pseudo-obstrucción del colon, íleo paralítico, pseudo-obstrucción intestinal idiopática crónica o íleo postoperatorio.

(viii) La composición farmacéutica según se menciona en (vi) o en (vii) que está destinada a una administración transmucosa.

(ix) La composición farmacéutica según se menciona en (viii) en la que la administración transmucosa es una administración pulmonar o intranasal.

(x) La composición farmacéutica según se menciona en (ix) en la que la administración transmucosa es una administración intranasal.

En el presente documento también se proporciona lo siguiente:

(xi) El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se menciona en (i), en los que X1 en la fórmula 1 es un α -aminoácido tal como fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) o triptófano (Trp), o β -homofenilglicina (Phg(C#CH₂)) o acetilnaftilalanina (Ac-Nal).

(xii) El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según se menciona en (xi), en los que X1 en la fórmula 1 es fenilalanina (Phe) o β -homofenilglicina.

(xiii) La composición farmacéutica según se menciona en (vi), en la que la enfermedad asociada con una anomalía funcional en el tracto gastrointestinal implica una caída en el valor basal de la actividad de la motilidad gastrointestinal.

(xiv) Un método para el tratamiento de afecciones caracterizadas por una caída en el valor basal de la actividad de la motilidad gastrointestinal, tales como dispepsia funcional, gastroparesia diabética, enfermedad por reflujo gastroesofágico, síndrome de intestino irritable, proliferación de pequeñas bacterias intestinales, pseudo-obstrucción del colon, íleo paralítico, pseudo-obstrucción intestinal idiopática crónica e íleo postoperatorio, comprendiendo el método la administración de la composición farmacéutica según se menciona en (vi) a un individuo.

Los nuevos compuestos peptídicos de tipo motilina según la presente divulgación tienen la actividad estimulante de la motilidad gastrointestinal de tipo motilina y muestran una mayor eficacia de absorción tras una administración transmucosa. Por lo tanto, los compuestos de la presente divulgación pueden usarse para el tratamiento de las enfermedades asociadas con anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, afecciones caracterizadas por una caída en el valor basal de la actividad de la motilidad gastrointestinal). Algunas enfermedades asociadas con anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal incluyen afecciones tales como dispepsia funcional, gastroparesia diabética, enfermedad por reflujo gastroesofágico, síndrome de intestino irritable, proliferación de pequeñas bacterias intestinales, pseudo-obstrucción del colon, íleo paralítico, pseudo-obstrucción intestinal idiopática crónica e íleo postoperatorio. Además, los compuestos de la presente divulgación tienen una mayor eficacia de absorción que la motilina nativa tras una administración transmucosa, y requieren ser administrados a unas dosis más bajas para alcanzar las concentraciones plasmáticas eficaces para el tratamiento de los pacientes.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una gráfica que muestra la actividad inductora del CMI en ayunas que aparece cuando se administra por vía intravenosa motilina nativa, el compuesto 4 y el compuesto 6.

La FIG. 2 es una gráfica que muestra un perfil de los niveles plasmáticos en ratas a las que se les administra por vía intravenosa motilina nativa.

La FIG. 3 es una gráfica que muestra los perfiles de los niveles plasmáticos, después de una administración pulmonar, de motilina nativa, del compuesto 2 (MT 114) y del compuesto 6 (MT 140).

La FIG. 4 es una gráfica que muestra los perfiles de los niveles plasmáticos en monos a los que se les administra por vía intravenosa motilina nativa y el compuesto 2 (MT 114).

La FIG. 5 es una gráfica que muestra los perfiles de los niveles plasmáticos en monos a los que se les administra por vía intranasal motilina nativa y el compuesto 2 (MT 114).

Se sabe que la motilina nativa tiene la porción N-terminal como un sitio esencial para desarrollar su actividad, y también se sabe que mientras que la motilina nativa forma una estructura en hélice α en solución en una región C terminal que se extiende desde las proximidades de la treonina en la 6ª posición [Andersson A. & Maler L., J. Biomol. RMN, 24, 103-112 (2002)], los derivados que tienen unas mutaciones introducidas a la estructura de la hélice α que está lejos del centro activo tienen reducida su capacidad para activar el receptor [Miller P et al., Peptides, 16, 11-18 (1995)]. Tomando como base los hallazgos proporcionados en estos documentos, los presentes inventores asumieron que la estructura de la hélice α contribuiría a la estabilización del centro activo en el N terminal. En otras palabras, creyeron que la presencia de la estructura de la hélice α serviría para proteger la estructura del centro

activo en el N terminal.

Por lo tanto, cuando se efectúan modificaciones estructurales que interrumpirían la ruta de degradación de la motilina, los presentes inventores seleccionaron los sitios que serían independientes de una posible caída en la actividad que podría dar como resultado la desestabilización de la estructura de la hélice α .

El aminoácido en la posición 1ª del N terminal de la motilina (que en lo sucesivo se denomina en el presente documento X1) es esencial para la activación del receptor, y por lo tanto debe ser deseablemente protegido frente a una degradación. Los presentes inventores creyeron que con objeto de conferir resistencia frente a la enzima degradativa, la extensión de la distancia desde el grupo amino N-terminal al enlace peptídico X1-Val, o la sustitución del enlace peptídico X1-Val por un enlace no amida, sería útil para la adquisición de resistencia frente a la degradación.

Además, el X2 en la motilina nativa es una prolina y define la estructura conformacional del compuesto, por lo que los presentes inventores creyeron que al mejorar su grado de libertad, sería posible controlar la capacidad de activación del receptor. En la motilina nativa, X3 es ácido glutámico y forma un enlace de hidrógeno con una cadena lateral con la treonina de la posición 6ª, contribuyendo aparentemente a la formación de la estructura en hélice α en la región que se extiende desde la posición 6ª hacia el extremo C terminal [Andersson A. & Maler L., J. Biomol. RMN, 24, 103-112 (2002)]. Dado que se sabe que una sustitución del X3 por alanina o ácido D-glutámico causaba una caída sustancial en la capacidad de activación del receptor [Miller P. et al., Peptides, 16, 11-18 (1995), y Peeters T. L., et al., Peptides, 13, 1103-1107 (1992)], X3 se selecciona deseablemente entre L-aminoácidos ácidos. Con respecto a X4, es una metionina en la motilina nativa, y reducirá la capacidad de activación del receptor por una oxidación de la cadena lateral. Por lo tanto, la metionina es deseablemente sustituida por leucina, que es sustancialmente comparable a ella en términos de tamaño de la cadena lateral.

La motilina es degradada por la dicarboxi peptidasa, partiendo del extremo C terminal. Los presentes inventores creyeron que la sustitución de los aminoácidos por prolina en el extremo C terminal de la motilina nativa fijaría el ángulo dihédrico alrededor del enlace peptídico y ofrecería resistencia a la degradación en virtud del impedimento estérico que acompañaría a la coordinación del sitio de unión del sustrato en el que la dicarboxi peptidasa se une al sustrato o al centro activo.

Por otro lado, dado que la estructura en hélice α de la motilina es importante para la capacidad de activación del receptor, los sitios para la sustitución de prolina que dificultan que la motilina forme la estructura en hélice α se consideran limitados. Desde estos puntos de vista, los presentes inventores concibieron una sustitución de X5 y/o del aminoácido en la posición 21 por prolina.

Fue a partir de estos puntos de vista que los presentes inventores diseñaron y sintetizaron derivados y los sometieron a un experimento de degradación usando un sobrenadante de homogeneizado pulmonar, y a un experimento de contracción usando un tracto intestinal extraído. Se sometió una serie de los compuestos peptídicos de tipo motilina según la presente invención que tenían una sustitución de glicina en la posición 21 de la motilina por prolina a un experimento de administración transmucosa *in vivo*, mediante el cual los presentes inventores confirmaron que esos compuestos mostraban una mayor susceptibilidad de absorción que la motilina nativa y todavía mantenían una actividad de inducción del CMI comparable a la de la motilina nativa; la presente invención se ha conseguido sobre la base de este hallazgo.

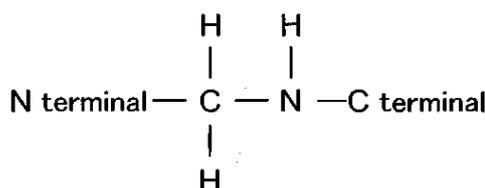
Los compuestos peptídicos de la presente divulgación son compuestos que comprenden la secuencia representada por la siguiente fórmula general 1, que se caracteriza por una sustitución de prolina en el aminoácido en la posición 21ª:

X1 Val X2 Ile Phe Thr Tyr Gly X3 Leu Gln Arg X4 Gln Glu Lys Glu Arg X5 Lys Pro Gln (fórmula 1) SEQ ID NO: 2

[en la que todos los enlaces entre aminoácidos, distintos al enlace X1-Val, son enlaces amida;

el enlace X1-Val es un enlace amida o un enlace representado por la siguiente fórmula 2

[Fórmula 2]



(fórmula 2)

X1 es un aminoácido aromático o un aminoácido heteroaromático;
 X2 es prolina o sarcosina;
 X3 es ácido glutámico o ácido aspártico;
 X4 es metionina o leucina;
 X5 es asparragina o prolina]

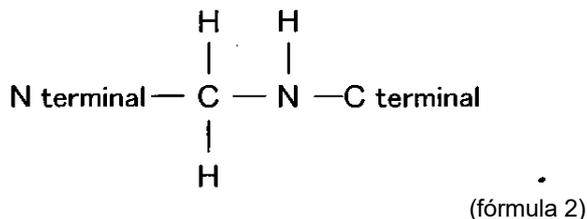
o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y están caracterizadas por mantener una actividad estimulante de la motilidad gastrointestinal comparable a la de la motilina nativa y todavía tienen una mayor susceptibilidad de absorción tras una administración transmucosa.

En la anterior fórmula 1, X1 es un aminoácido aromático o un aminoácido heteroaromático. El aminoácido aromático o el aminoácido heteroaromático se refiere a cualquier aminoácido que contenga un anillo aromático en el mismo, y algunos ejemplos incluyen, por ejemplo, α -aminoácidos tales como fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp), así como β -homofenilglicina (Phg(C#CH₂)), acetilnaftilalanina (Ac-Nal), y similares. En la presente divulgación pueden mencionarse fenilalanina (Phe), β -homofenilglicina (Phg(C#CH₂)) y acetilnaftilalanina (Ac-Nal) como los ejemplos más preferidos del aminoácido X1.

En la anterior fórmula 1, X1 puede ser un L-aminoácido o un D-aminoácido. En la técnica anterior, hasta ahora se han preparado variantes mediante la sustitución de los L-aminoácidos por D-aminoácidos como el aminoácido en la posición 1 de la motilina (Miller P. et al., Peptides, 16, 11-18 (1995)), y se ha demostrado que esas variantes mantienen la actividad de la motilina.

En la anterior fórmula 1, X2 es prolina (Pro) o sarcosina (Sar, denominada también N-metilglicina o MeGly); X3 es ácido glutámico (Glu) o ácido aspártico (Asp); X4 es metionina (Met) o leucina (Leu); y X5 es asparragina (Asn) o prolina (Pro). Los aminoácidos marcados como X1 hasta X5 pueden usarse en cualquier combinación.

En los compuestos peptídicos de la anterior fórmula 1, el enlace entre el primer aminoácido (X1) y el segundo aminoácido (Val) es un enlace amida o un enlace representado por la siguiente fórmula 2



El enlace de la fórmula 2 también se denomina un enlace -psi[CH₂NH]-. El enlace X1-Val puede ser tanto un enlace amida como un enlace -psi[CH₂NH]-, independientemente del tipo de aminoácido que constituya X1.

Los compuestos de la anterior fórmula 1 de la presente invención incluyen, por ejemplo, los compuestos representados por las siguientes secuencias o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 3);

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 4);

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Asp Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 5);

Phg(C#CH₂) Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 6);

Phg(C#CH₂) Val Sar Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 7);

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 8);

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 9);

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 10);

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 11);

Phg(C#CH₂) Val Sar Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 12);

Ac-Nal Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 13);

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Asp Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 14);

5 Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Asp Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 15).

Los compuestos según la presente invención pueden ser obtenidos mediante los métodos convencionales. Por ejemplo, puede ser producidos mediante una síntesis química, la tecnología de ADN recombinante (en el caso de los péptidos formados únicamente por L-aminoácidos), o combinaciones de los mismos.

10 Ya se han establecido diversos métodos para la síntesis química de péptidos, y los compuestos de la presente invención también pueden ser producidos fácilmente mediante métodos conocidos. Por ejemplo, pueden emplearse los métodos clásicos de síntesis de péptidos y los métodos en fase sólida. Específicamente, los aminoácidos con grupos protectores se concentran mediante un método en fase líquida y/o un método en fase sólida, después se extiende la cadena peptídica, y a continuación opcionalmente se escinde el grupo protector N-terminal con una base tal como piperazina, todos los grupos protectores y la resina se eliminan con un ácido, y el producto en bruto resultante se purifica mediante un procedimiento de separación/purificación tal como una filtración en gel, una ultrafiltración, una diálisis, una SDS-PAGE o diversas técnicas cromatográficas, tras lo cual pueden obtenerse los péptidos de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser producidos mediante los métodos descritos en libros tales como "Seikagaku Jikken Koza 1 Tanpakushitu no Kagaku (Course of Biochemical Experimentation 1, Chemistry of Protein)," Vol. 4, capítulos 2 y 3 (escrito en japonés, Tokyo Kagaku Dojin) y "Zoku Iyakuhiin no Kaihatsu 14 Peptide Gosei (Drug Development 14, Sequel Version, Peptide Synthesis)" (escrito en japonés, Hirokawa Shoten).

25 Entre los compuestos de la presente invención, aquellos que tienen el enlace -psi[CH₂NH]- de la fórmula 2 como un enlace entre aminoácidos también pueden ser obtenidos mediante una síntesis química. Por ejemplo, en el caso de sintetizar un compuesto en el que el enlace X1-Val en la fórmula 1 es el enlace -psi[CH₂NH]-, se aplica el método descrito anteriormente para extender la cadena peptídica desde el C terminal hasta el aminoácido en la posición 2 (Val en la fórmula 1) y después el grupo protector del grupo α -amino del aminoácido en la posición 2 es escindido químicamente; a continuación se introduce un aldehído de un aminoácido Boc- o Fmoc- mediante una reacción de alquilación reductora con cianotrihidroborato de sodio/ácido acético al 1 %, seguido de la eliminación de la resina y la desprotección con un ácido de la misma forma a la descrita anteriormente, para obtener un producto en bruto, que posteriormente es purificado mediante un procedimiento de separación/purificación tal como una filtración en gel, una ultrafiltración, una diálisis, una SDS-PAGE o diversas técnicas cromatográficas, tras lo cual pueden obtenerse los análogos peptídicos deseados de la presente divulgación.

Los péptidos formados únicamente por L-aminoácidos naturales pueden ser producidos mediante la tecnología del ADN recombinante. Específicamente, puede cultivarse una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que tiene un ADN que codifica para la secuencia peptídica según la presente invención, para recoger el péptido deseado a partir del cultivo resultante.

Algunos ejemplos del vector en el que puede incorporarse el gen incluyen vectores de *E. coli* (por ejemplo, pBR322, pUC18 y pUC19), vectores de *B. subtilis* (por ejemplo, pUB110, pTP5 y pC194), vectores de levadura (por ejemplo, de los tipos YEp, YRp e YIp) y vectores de células animales (por ejemplo, de retrovirus y del virus de la variolovacuna), pero únicamente pueden usarse otros vectores siempre que sean capaces de retener de forma estable el gen deseado en la célula hospedadora. El vector de interés es introducido en una célula hospedadora adecuada. Pueden utilizarse diversos métodos para la incorporación del gen deseado en un plásmido o para introducirlo en una célula hospedadora, y algunos ejemplos de métodos se describen en Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989).

50 Para expresar el gen del péptido deseado en el plásmido mencionado anteriormente, se une funcionalmente un promotor secuencia arriba de ese gen. Puede usarse cualquier promotor en la presente divulgación siempre que sea apropiado para la célula hospedadora que se usa para expresar el gen deseado. Por ejemplo, si la célula hospedadora que se va a transformar es del género *Escherichia*, puede usarse un promotor lac, un promotor trp, un promotor lpp, un promotor λ PL, un promotor recA, etc.; en el caso del género *Bacillus*, puede usarse un promotor SP01, un promotor SP02, un promotor penP, etc.; en el caso de las levaduras, puede usarse un promotor GAP, un promotor PH05, un promotor ADH, etc.; y en el caso de células animales, puede usarse un promotor SV40, un promotor CMV, un promotor derivado de un retrovirus, etc.

60 Cuando una célula hospedadora va a ser transformada con el vector así obtenido que contiene un gen de interés, la célula hospedadora que se va a usar puede ser bacteriana (por ejemplo, del género *Escherichia* y del género *Bacillus*), de levadura (del género *Saccharomyces*, del género *Pichia* y del género *Candida*), células animales (células CHO, células COS, etc.), y similares. Los medios líquidos son adecuados como medio de cultivo, y particularmente se prefiere que contengan fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y otros nutrientes que son necesarios para el crecimiento de la célula transformada que se está cultivando. Si se desea, pueden añadirse vitaminas, factores promotores del crecimiento, sueros, etc. Con objeto de purificar el compuesto de la presente

invención a partir del medio de cultivo que contiene el derivado peptídico de la presente invención, pueden emplearse los mismos procedimientos de separación/purificación que los usados para obtener los compuestos peptídicos mediante una síntesis química.

5 Los compuestos de la presente divulgación pueden usarse en el tratamiento de enfermedades que implican anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, afecciones que están caracterizadas por una caída en el valor basal de la actividad de la motilidad gastrointestinal). Las anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal son afecciones que presentan unos síntomas desagradables en el tracto gastrointestinal, aunque no se detectan unas anomalías orgánicas apreciables, tales como inflamaciones y úlceras, mediante una endoscopia,
10 un análisis de sangre, etc. y un grupo de enfermedades que se denominan en conjunto "trastornos gastrointestinales funcionales" se clasifican y se definen finalmente por sus síntomas según los criterios de ROME III (Gastroenterology 130: 1377-1556, 2006). Las enfermedades que implican anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal incluyen afecciones tales como dispepsia funcional, gastroparesia diabética, enfermedad por reflujo gastroesofágico, síndrome de intestino irritable, proliferación de pequeñas bacterias intestinales, pseudo-obstrucción del colon, íleo paralítico, pseudo-obstrucción intestinal idiopática crónica e íleo postoperatorio.

Debería mencionarse que las anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal son diagnosticadas no solo mediante los síntomas subjetivos, tales como dolor abdominal, náuseas, vómitos, diarrea, estreñimiento, náuseas, pirosis, meteorismo abdominal y pérdida de apetito, sino también por ensayos objetivos tales como la medición de la presión en el tracto gastrointestinal, un análisis de los jugos gástricos, una monitorización del pH gástrico, una prueba de vaciado gástrico, un análisis por rayos X gastrointestinal y una endoscopia.

Los compuestos de la presente divulgación o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden usarse en animales, incluyendo el hombre, en unas cantidades suficientes para conferir la actividad estimulante de la motilidad gastrointestinal deseada, tanto solos como en una mezcla con excipientes, agentes de relleno, portadores farmacéuticamente aceptables conocidos etc.

Para los propósitos de la presente invención, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales con bases inorgánicas, sales con bases orgánicas, sales con ácidos inorgánicos, sales con ácidos orgánicos, y sales con aminoácidos básicos o ácidos, pero estos no son los únicos ejemplos, y puede usarse cualquier sal común.

Los compuestos peptídicos según la presente divulgación también pueden ser administrados a través de varias vías de inyección, tales como una inyección subcutánea, una inyección intramuscular y una inyección intravenosa. Además, dado que los compuestos peptídicos según la presente divulgación proporcionan una elevada absorción tras una administración transmucosa, pueden ser administrados a través de las vías transmucosas, a saber, vías sin inyección tales como la vía oral, intranasal, pulmonar, transoromucosa y transvaginal, así como una instilación ocular. Deseablemente, los compuestos son administrados por vía oral, intranasal o pulmonar, y lo más deseablemente, son administrados por vía pulmonar o intranasal.

40 Cuando los presentes compuestos se usan para el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente, su dosis depende del estado del paciente, del grado del efecto terapéutico deseado, de la vía de administración, de la frecuencia de administración, etc. y, en el caso de una administración en el hombre, la dosis puede variar desde un nivel bajo de 0,01 µg/kg. Una dosis preferida puede ser de 0,01-500 µg/kg, más preferentemente de 0,05-100 µg/kg. Las cantidades de estos intervalos pueden ser administradas deseablemente 1-3 veces al día.

Los compuestos peptídicos de la presente invención o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden usarse junto con portadores farmacéuticamente aceptables. Algunos portadores farmacéuticamente aceptables que pueden usarse incluyen diversas sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas que son convencionales como artículos farmacéuticos, y se combinan en forma de excipientes, lubricantes, aglutinantes, disgregantes o similares en preparaciones sólidas, y como disolventes, solubilizantes, agentes suspensores, agentes de tonicidad, tampones, antisépticos, antioxidantes o similares en preparaciones líquidas. Un ejemplo típico de excipiente es la lactosa; algunos ejemplos típicos de lubricantes son el talco y la sílice coloidal. Algunos ejemplos típicos de disolventes son agua para inyección, prolina glicol, aceite de sésamo y aceite de maíz; algunos agentes suspensores incluyen tensioactivos tales como estearil trietanolamina, lauril sulfato de sodio, ácido laurilaminopropiónico, lecitina y monoestearato de glicerilo, pero por supuesto pueden usarse otros artículos farmacéuticos habituales.

Ejemplos

60 En las siguientes páginas se describe la presente invención más específicamente mediante referencia a los ejemplos de trabajo, a los ejemplos comparativos y similares, pero debería entenderse que la presente invención no está limitada en modo alguno a los ejemplos de trabajo.

Los significados de las principales abreviaturas usadas en los ejemplos de trabajo se muestran a continuación.

65 Phg(C#CH₂): L-β-homofenilglicina

Ac-Nal: acetilnaftilalanina
 Sar: L-sarcosina
 CH₂-NH: enlace -psi[CH₂NH]- (denominado también pseudoenlace)
 Fmoc: fluorenilmetiloxicarbonilo
 5 Boc: t-butiloxicarbonilo
 TFA: ácido trifluoroacético
 Trt: tritilo
 HBTU: hexafluorofosfato de N-[(1H-benzotriazol-1-il)dimetilaminometilen]-N-metilmetanoaminio N-óxido
 HOBt: 1-hidroxibenzotriazol
 10 DCC: N,N'-diciclohexilcarbodiimida
 TIPS: triisopropilsilano

Síntesis de compuestos

15 Considerando la ruta de degradación de la motilina por parte de la enzima degradativa, la estabilidad de la metionina en la posición 13^a, la retención de la actividad fisiológica de la motilina y otros factores, se sintetizaron los compuestos peptídicos de tipo motilina identificados a continuación. Además, se sintetizó motilina nativa como referencia con fines comparativos. Los compuestos comparativos 1 y 2, así como los presentes compuestos 1-13, tenían las siguientes secuencias de aminoácidos.

20 Motilina nativa: Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Gly Gln (SEQ ID NO: 1);
 Compuesto comparativo 1 (¹³Leu-motilina): Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Gly Gln (SEQ ID NO: 16);
 25 Compuesto comparativo 2 (MT139): Phe*Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Gly Gln (SEQ ID NO: 17);
 Compuesto 1 (MT095): Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 3);
 Compuesto 2 ((MT114): Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 4);
 30 Compuesto 3 (MT116): Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Asp Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 5);
 Compuesto 4 (MT124): Phg(C#CH₂) Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 6);
 35 Compuesto 5 (MT126): Phg(C#CH₂) Val Sar Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 7);
 Compuesto 6 (MT140): Phe*Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 8);
 Compuesto 7 ((MT141): Phe*Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 9);
 40 Compuesto 8 (MT107): Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 10);
 Compuesto 9 (MT115): Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 11);
 45 Compuesto 10 (M125): Phg(C#CH₂) Val Sar Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 12);
 Compuesto 11 (MT128): Ac-Nal Val Pro He Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 13);
 Compuesto 12 (MT154): Phe*Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Asp Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 14);
 50 Compuesto 13 (MT155): Phe*Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Asp Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys Glu Arg Pro Lys Pro Gln (SEQ ID NO: 15).

55 Si se usa el enlace -psi[CH₂NH]- como el enlace con el primer aminoácido (correspondiente a X1) y se usa Val en cualquiera de los compuestos identificados anteriormente, el enlace está representado por el asterisco (*).

60 Para extender la cadena peptídica se usó principalmente un sintetizador peptídico (433A, producto de Applied Biosystems) y se construyó un derivado peptídico/resina protegida mediante el método de Fmoc y finalmente se introdujo un aminoácido Boc en el extremo N terminal. La resina peptídica protegida resultante se desprotegió con ácido trifluoroacético (TFA) o con TFA diluido que contenía diversos capturadores, y el péptido liberado se sometió a un procedimiento de purificación. Mediante una HPLC en fase inversa usando una columna C 18, se llevaron a cabo tanto la purificación como la comprobación de la pureza; después se verificó la estructura mediante un análisis de masas.

65 Los compuestos peptídicos de la presente invención pueden ser sintetizados mediante los métodos habituales de síntesis peptídica; como ejemplos típicos, a continuación se describen las síntesis del compuesto 1 (MT095) y del

compuesto 6 (MT140).

Ejemplo 1: síntesis del Compuesto 1 (MT095)

5 Este ejemplo se llevó a cabo con el fin de sintetizar químicamente el compuesto 1 (MT095, SEQ ID NO: 3).

10 Se trató una resina Fmoc-Gln(Trt)-Alko (producto de WATANABE CHEMICAL; 47,6 mg, 0,03 mmol) con piperazina al 20 % durante 20 minutos, y después se repitieron la introducción de los aminoácidos Fmoc mediante HBTU/HOBt y la eliminación de Fmoc mediante piperazina, partiendo del extremo C terminal de la SEQ ID NO: 3 de forma secuencial, para construir así un Fmoc-péptido-resina. Finalmente se introdujo el Boc-Phe-OH por medio de DCC/HOBt y a la resina peptídica protegida resultante se le añadió un reactivo desprotector (5,0 ml) que contiene no solo un 90 % de ácido trifluoroacético, sino también fenol, agua y TIPS, y la mezcla se agitó durante 2 horas a la temperatura ambiente. La resina se eliminó mediante una filtración y el filtrado se concentró; a continuación se añadió éter al residuo para formar un precipitado. El precipitado se recuperó mediante una filtración y se secó para dar aproximadamente 30 mg de un producto peptídico en bruto.

20 El producto peptídico en bruto se disolvió en 1,0 ml de ácido acético 1 N y después de cargar la solución en una columna Inertsil PREP ODS (ϕ 20 mm x 250 mm; producto de GL Sciences, Inc.), se llevó a cabo la elución a un gradiente lineal del 0 % al 50 % de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1 % durante 50 minutos (caudal: 10 ml/min). Con una monitorización UV (a 220 nm), las fracciones deseadas se clasificaron para recuperarlas y se liofilizaron, para dar aproximadamente 5,0 mg del producto final.

25 El producto final obtenido se cargó en una columna Inertsil PREP ODS (ϕ 4,6 mm x 250 mm; producto de GL Sciences, Inc.), se llevó a cabo la elución a un gradiente lineal del 5 % al 65 % de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1 % durante 30 minutos (caudal: 1,5 ml/min). Con una monitorización UV (a 220 nm), se midió la pureza del producto final.

30 El producto final obtenido se sometió a una MALDI TOF-EM (Daltonics BIFLEX III, producto de Bruker) para la verificación de su peso molecular y un análisis de los aminoácidos (que consiste en un tratamiento con HCl 6 N a 110 °C durante 24 horas hasta que el producto se hidroliza en sus aminoácidos, que fueron cuantificados respectivamente mediante una HPLC) para verificar el contenido en péptidos. Valor medido con la MALDI-TOF EM: 2738,718 (teórico, 2739,2); pureza con una HPLC analítica: 96,0 %; contenido en péptidos mediante un análisis de los aminoácidos: 643 μ g/mg.

35 Ejemplo 2: síntesis del Compuesto 6 (MT140)

Este ejemplo se llevó a cabo con el fin de sintetizar químicamente el compuesto 6 (MT140, SEQ ID NO: 8).

40 Se trató una resina Fmoc-Gln(Trt)-Alko (producto de WATANABE CHEMICAL; 47,6 mg, 0,03 mmol) con piperazina al 20 % durante 20 minutos y después se repitieron la introducción de los aminoácidos Fmoc mediante HBTU/HOBt y la eliminación de Fmoc mediante piperazina, partiendo del extremo C terminal de la SEQ ID NO: 8 de forma secuencial, para construir así un Fmoc-péptido-resina. Finalmente se introdujo el aldehído Boc-Phe por medio de cianotrihidroborato de sodio/ácido acético al 1 % y a la resina peptídica protegida resultante se le añadió un reactivo desprotector (5,0 ml) que contiene no solo un 90 % de ácido trifluoroacético, sino también fenol, agua y TIPS, y la mezcla se agitó durante 2 horas a la temperatura ambiente. La resina se eliminó mediante una filtración y el filtrado se concentró; a continuación se añadió éter al residuo para formar un precipitado. El precipitado se recuperó mediante una filtración y se secó para dar aproximadamente 30 mg de un producto peptídico en bruto.

50 El producto en bruto se disolvió en 1,0 ml de ácido acético 1 N y después de cargar la solución en una columna Inertsil PREP ODS (ϕ 20 mm x 250 mm; producto de GL Sciences Inc.), se llevó a cabo la elución a un gradiente lineal del 0 % al 50 % de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1 % durante 50 minutos (caudal: 10 ml/min). Con una monitorización UV (a 220 nm), las fracciones deseadas se recuperaron y se liofilizaron para dar aproximadamente 5,0 mg del producto final.

55 El producto final obtenido se cargó en una columna Inertsil PREP ODS (ϕ 4,6 mm x 250 mm; producto de GL Sciences Inc.), se llevó a cabo la elución a un gradiente lineal del 5 % al 65 % de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1 % durante 30 minutos (caudal: 1,5 ml/min). Con una monitorización UV (a 220 nm), se midió la pureza del producto final.

60 El producto final obtenido se sometió a una MALDI TOF-EM (Daltonics BIFLEX III, producto de Bruker) para la verificación de su peso molecular. Valor medido con la MALDI-TOF EM: 2725,040 (teórico, 2725,2); pureza con una HPLC analítica: 98,7 %; contenido en péptidos mediante un análisis de los aminoácidos: 707 μ g/mg.

65 Mediante técnicas similares se produjeron la motilina nativa así como los compuestos 1-13 (de las SEQ ID NOS: 3-15, respectivamente) y los compuestos comparativos 1 y 2 (de las SEQ ID NOS: 16 y 17, respectivamente). Sus valores de EM están recogidos en la Tabla 1 junto con los valores peptídicos determinados mediante un análisis de

los aminoácidos.

[Tabla 1]

5 Tabla 1: valores de la EM y contenido en péptidos de los compuestos

Nombre del compuesto	Estructura	Contenido en péptidos (%) (análisis de los aminoácidos)	Valores medidos de la EM (teóricos)
Motilina nativa	FVPIFTYGELQRMQEKERKNGQ (SEQ ID NO: 1)	88,6	2698,382 (2699,1)
Compuesto comparativo 1 (¹³ Leu- motilina)	FVPIFTYGELQRLQEKERKNGQ (SEQ ID NO: 16)	73,1	2680,432 (2681,0)
Compuesto comparativo 2 (MT139)	F*VPIFTYGELQRMQEKERKNGQ (SEQ ID NO: 17)	71,8	2683,998 (2685,1)
Compuesto 1 (MT095)	FVPIFTYGELQRMQEKERKPKQ (SEQ ID NO: 3)	64,3	2738,718 (2739,2)
Compuesto 2 (MT114)	FVPIFTYGELQRLQEKERKPKQ (SEQ ID NO: 4)	75,8	2720,544 (2721,1)
Compuesto 3 (MT116)	FVPIFTYGDLQRLQEKERPKQ (SEQ ID NO: 5)	76,8	2689,574 (2690,1)
Compuesto 4 (MT124)	Phg(C#CH ₂)-VPIFTYGELQRLQEKERPKQ (SEQ ID NO: 6)	75,7	2703,920 (2704,1)
Compuesto 5 (MT126)	Phg(C#CH ₂)-V-Sar-IFTYGELQRLQEKERPKQ (SEQ ID NO: 7)	58,3	2677,60 (2677,0)
Compuesto 6 (MT140)	F*VPIFTYGELQRMQEKERKPKQ (SEQ ID NO: 8)	70,7	2725,040 (2725,2)
Compuesto 7 (MT141)	F*VPIFTYGELQRLQEKERKPKQ (SEQ ID NO: 9)	70,3	2706,980 (2707,1)
Compuesto 8 (MT107)	FVPIFTYGELQRMQEICERPKQ (SEQ ID NO: 10)	-	2721,272 (2722,2)
Compuesto 9 (MT115)	FVPIFTYGELQRLQEKERPKQ (SEQ ID NO: 11)	-	2703,463 (2704,1)
Compuesto 10 (MT125)	Phg(C#CH ₂)-V-Sar-IFTYGELQRMQEKERPKQ (SEQ ID NO: 12)	-	2695,845 (2695,1)
Compuesto 11 (MT128)	Ac-Nal-VPIFTYGELQRMQEKERKPKQ (SEQ ID NO: 13)	-	2830,62 (2831,2)
Compuesto 12 (MT154)	F*VPIFTYGDLQRLQEKERPKQ (SEQ ID NO: 14)	-	2676,598 (2676,1)
Compuesto 13 (MT155)	F*VPCFTYGDLQRMQEKERPKQ (SEQ ID NO: 15)	-	2693,923 (2694,2)
Notas: el contenido en aminoácidos no se midió para los compuestos 8-13. El asterisco (*) en las estructuras del compuesto comparativo 2, así como en los compuestos 6, 7, 12 y 13, indica que el enlace entre los aminoácidos adyacentes es un enlace -psi[CH ₂ NH]-.			

Ejemplo 3: medición de la actividad inductora del CMI en ayunas

10 Este ejemplo se llevó a cabo con el fin de medir la actividad inductora del CMI en ayunas en el cuerpo del perro por parte de los compuestos preparados mediante los métodos descritos en Ejemplos 1 y 2.

15 Según el método de ITOH et al. (Zen Itoh et al, Gastroenterologia Japonica 12; 275-283, 1977), la actividad inductora del CMI en ayunas de los compuestos fue evaluada mediante la medición del movimiento contráctil del tracto gastrointestinal de un perro consciente en el que se habían suturado transductores de fuerza. Más específicamente, se sometieron a los perros bajo anestesia a una operación quirúrgica en la que se suturaron transductores de fuerza a las membranas serosas del antro gástrico, el duodeno, el yeyuno y el íleo a lo largo del músculo circular, y a continuación, se envió la tensión de cada transductor a un registrador a través de un amplificador.

20 Aproximadamente 10 minutos después de la finalización del CMI espontáneo en el periodo de ayuno (10 minutos después de fuertes contracciones del estómago), a los perros conscientes se les inyectaron rápidamente por vía intravenosa 0,1 µg/kg de motilina nativa o de compuestos derivados de la motilina seleccionados, y se observaron los movimientos contráctiles gastrointestinales resultantes. Los compuestos de prueba administrados indujeron unas fuertes contracciones del estómago, y su propagación hacia el duodeno se definió como un CMI; un compuesto fue evaluado como una "actividad inductora positiva en el CMI" cuando indujo el CMI a una dosis de 0,1 µg/kg.

La FIG. 1 representa los patrones de la actividad inductora del CMI observados cuando se administraron por vía intravenosa tanto la motilina nativa como el compuesto 4 (MT124) y el compuesto 6 (MT140) a una dosis de 0, µg/kg, y la Tabla 2 muestra resultados de la comprobación de la motilina nativa y de los compuestos derivados de la motilina seleccionados para la actividad inductora del CMI en ayunas. En la FIG. 1, las flechas indican la cronología de administración de la motilina nativa, así como la de los compuestos 4 y 6. Según se muestra en la FIG. 1, el antro gástrico comenzó a contraerse cuando se administró la motilina nativa (en el punto temporal indicado por la t) y la contracción continuó durante aproximadamente 10 minutos. Inmediatamente después de su comienzo en el antro gástrico, la contracción se propagó hasta el duodeno que, al igual que el antro gástrico, continuó con la contracción durante aproximadamente 10 minutos. Cuando se administraron el compuesto 4 (MT124) y el compuesto 6 (MT140) por vía intravenosa, se produjeron contracciones con el mismo patrón al descrito anteriormente para la administración de la motilina nativa. También está claro, a partir de la FIG. 1 y de la Tabla 2, que no solo la motilina nativa y el compuesto 4 (MT124) y el compuesto 6 (MT140), sino también cualquier otro compuesto derivado de la motilina de la presente invención, indujeron un CMI en ayunas similar al CMI espontáneo, y su intensidad era casi comparable a la del CMI inducido por la motilina nativa.

[Tabla 2]

Tabla 2: actividad inductora del CMI en ayunas en perros a los que se les administró por vía intravenosa motilina nativa y derivados de la motilina

Nombre del compuesto	Dosis (µg/kg)	Actividad inductora del CMI
Motilina nativa	0,1	Positiva
Compuesto comparativo 1 (¹³ Leu-motilina)	0,1	Positiva
Compuesto comparativo 2 (MT139)	0,1	Positiva
Compuesto 1 (MT095)	0,1	Positiva
Compuesto 2 (MT114)	0,1	Positiva
Compuesto 3 (MT116)	0,1	Positiva e
Compuesto 4 (MT124)	0,1	Positiva
Compuesto 5 (MT126)	0,1	Positiva
Compuesto 6 (MT140)	0,1	Positiva
Compuesto 7 (MT141)	0,1	Positiva
Compuesto 8 (MT107)	0,1	Positiva
Compuesto 9 (MT115)	0,1	Positiva
Compuesto 10 (MT125)	0,1	Positiva

A partir de estos resultados quedó claro que todos los compuestos que se prepararon en los Ejemplos 1 y 2 tenían el mismo nivel de actividad inductora del CMI en ayunas que la motilina nativa.

Ejemplo comparativo 1: experimento farmacocinético con motilina nativa administrada por vía intravenosa en ratas

Se administró motilina nativa a ratas por vía intravenosa y se midieron sus niveles plasmáticos.

La administración intravenosa se llevó a cabo con ratas que tenían un tubo de polietileno (PE-50; producto de Clay Adams) insertado previamente en la arteria femoral. Como animales de ensayo, se sometieron ratas SD macho de 7 semanas de edad (adquiridas en CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.) que consistían en 3 ratas por grupo, al siguiente experimento. Se disolvió la motilina nativa en una solución de manitol al 5 % para preparar una solución con una concentración de 100 µg/ml, y esta solución se administró a cada rata a una dosis de 1 ml/kg a través de la vena de la cola mediante una jeringa y una aguja de calibre 26G (siendo ambos productos de TERUMO). Antes de la administración y 1, 3, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos después de la administración, se tomaron muestras de sangre a través del tubo de polietileno insertado en la arteria femoral.

A la muestra de sangre recogida se añadió inmediatamente una solución de EDTA al 10 % · 2 Na · 2 H₂O a una proporción en volumen de 1:100, y el plasma se separó mediante una centrifugación. El plasma se mezcló inmediatamente con una solución de 5.000 UI/ml de aprotinina a una proporción en volumen de 1:10 y se almacenó a -80 °C hasta su uso en la medición.

La medición de la concentración plasmática de la motilina nativa se llevó a cabo mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) usando un anticuerpo anti-motilina. Más específicamente, después de añadir un anticuerpo anti-motilina a la muestra de plasma, se añadió [¹²⁵I-Tyr7] motilina para que tuviera lugar una reacción competitiva. Mediante la posterior adición de un anticuerpo secundario, se precipitó la unión de la motilina al anticuerpo anti-motilina, y después de la separación del sobrenadante, se midió la radioactividad en la fracción

precipitada con un contador γ (producto de PerkinElmer).

El perfil obtenido de la concentración plasmática de la motilina nativa está representado en la FIG. 2. A partir de este perfil se calculó la concentración plasmática en el tiempo cero (C0) y el área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas (AUC) como parámetros farmacocinéticos; el C0 se determinó mediante una extrapolación, y el AUC mediante el método de los trapecios. Se calculó que los valores del C0 y del AUC resultantes de la administración intravenosa de la motilina nativa a una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ eran de 1.797 ng/ml y de 3.598 ng*min/ml, respectivamente.

10 Ejemplo 4: experimento farmacocinético con motilina nativa y compuestos derivados de la motilina administrados por vía pulmonar en ratas

Este ejemplo se llevó a cabo con el fin de medir mediante un RIA los cambios que se produjeron en las ratas en términos de las concentraciones plasmáticas de la motilina nativa y de los compuestos derivados de la motilina administrados por vía pulmonar. Cuando se aplica la técnica del RIA, se detectan todas las sustancias que reaccionan con el anticuerpo anti-motilina, por lo que aparte de las formas inalteradas, también es probable que se detecten los metabolitos que reaccionan con el anticuerpo. Por lo tanto, después de la administración por vía pulmonar de la motilina nativa y de los compuestos derivados de la motilina en ratas, el plasma recogido se fraccionó mediante una HPLC y se midió la actividad inmunológica en cada fracción para demostrar que la sustancia que reaccionaba con el anticuerpo estaba en una forma inalterada, lo que verifica la idoneidad de la técnica del RIA como método para la medición de los cambios en la concentración plasmática.

Para ser más específicos, se insertó un tubo de polietileno (PE-240; producto de Clay Adams) en la tráquea de ratas SD macho de 7 semanas de edad (adquiridas en CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.); se disolvieron la motilina nativa o el compuesto 2 (MT114) en una solución acuosa de ácido acético 0,1 N para preparar una solución con una concentración de 1 mg/ml y se administraron 25 μl de la solución en el tubo de polietileno a través de la tráquea por medio de un dispositivo de pulverización de líquidos intratraqueal (MicroSprayer; producto de Penn Century). Cinco minutos después de la administración se recogió sangre a través de la aorta abdominal y se trató como en el Ejemplo comparativo 1 para separar el plasma. Después de un pretratamiento con un cartucho Sep-Pak C18 (producto de Waters), el plasma se fraccionó mediante su inyección en una HPLC (LC-10A; producto de Shimadzu Corporation) equipada con una columna Cosmosil 5C18 (producto de nacalai tesque). Para cada muestra se muestreó un eluido a intervalos de un minuto desde justo después de la inyección de la muestra hasta 40 minutos después de la inyección de la muestra, y se midió la actividad inmunológica en cada fracción mediante un RIA. Como resultado, en cada una de las muestras plasmáticas, se detectó un pico de actividad inmunológica únicamente en el punto de elución correspondiente al compuesto administrado (en su forma inalterada) y no se observó ningún otro pico. Dado que estos resultados sugieren que el compuesto detectado en el plasma después de la administración pulmonar estaba en una forma inalterada, con una probabilidad muy pequeña de presencia de metabolitos, se demostró que la técnica de RIA era adecuada como un método de ensayo para su uso en el ejemplo en consideración.

La administración pulmonar de las muestras también se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente usando ratas que tenían un tubo de polietileno previamente insertado en la arteria femoral. Como animales de ensayo se sometieron ratas SD macho de entre 7 y 10 semanas de edad (adquiridas en CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.) que consistían en 3 ratas por grupo al siguiente experimento. Se disolvió motilina nativa o compuestos derivados de la motilina en una solución acuosa de ácido acético 0,1 N para preparar una solución con una concentración de 1 mg/ml y se administraron 25 μl de la solución en el tubo de polietileno a través de la tráquea por medio de un dispositivo de pulverización de líquidos intratraqueal (MicroSprayer; producto de Penn Century). Antes de la administración y 5, 10, 20, 30 y 60 minutos después de la administración se tomaron muestras de sangre a través del tubo de polietileno insertado en la arteria femoral. Las muestras de sangre recogidas se trataron como en el Ejemplo comparativo 1 para separar el plasma, y se midieron las concentraciones plasmáticas de la motilina nativa y de los compuestos derivados de la motilina mediante un RIA. En la medición se usaron los respectivos derivados como sustancias patrones para la construcción de las curvas de calibración para la determinación de los niveles plasmáticos.

Los perfiles de las concentraciones plasmáticas de la motilina nativa, así como del compuesto 2 (MT114) y del compuesto 6 (MT140) después de una administración pulmonar se muestran en la FIG. 3. Como también es evidente a partir de la FIG. 3, en comparación con el perfil de la concentración plasmática de la motilina después de una administración pulmonar de la motilina nativa a las ratas, las concentraciones plasmáticas del compuesto 2 (MT114) y del compuesto 6 (MT140) después de una administración pulmonar a las ratas tenía unos picos mayores, que demuestran que esos compuestos podrían mantener unas concentraciones *in vivo* mayores durante un periodo más largo que la motilina nativa.

Sobre la base de los perfiles de la motilina nativa o de los compuestos derivados de la motilina en plasma según se han obtenido mediante las pruebas descritas anteriormente, se calculó la concentración plasmática máxima (C_{máx}) y el área bajo la curva para las concentraciones plasmáticas (AUC) como parámetros farmacocinéticos; la C_{máx} se determinó a partir de los valores observados, y el AUC mediante el método de los trapecios. Usando estos valores

se calculó la biodisponibilidad (BD (%)) mediante la siguiente ecuación:

$$BD (\%) = [(AUC/Dosis) / (AUC (motilina_{iv}) / Dosis (motilina_{iv}))] \times 100$$

- 5 AUC: AUC (ng*min/ml) después de una administración pulmonar
 Dosis: dosis (µg/kg) en la administración pulmonar
 AUC (motilina_{iv}): AUC (ng*min/ml) después de la administración intravenosa de la motilina nativa
 Dosis (motilina_{iv}): dosis (µg/kg) en la administración intravenosa de la motilina nativa.
- 10 Los parámetros farmacocinéticos de la motilina nativa y de los compuestos derivados de la motilina se muestran en la siguiente Tabla 3.

[Tabla 3]

- 15 Tabla 3: parámetros farmacocinéticos de la motilina nativa y de los compuestos derivados de la motilina administrados por vía pulmonar en ratas

Nombre del compuesto	Dosis		C _{máx} (ng/ml)	AUC (ng*min/ml)	BD (%)
	(mg/rata)	(mg/kg)			
Motilina nativa	25	80,7 ± 2,6	7,84 ± 0,98	94,9 ± 5,7	3,3 ± 0,1
Compuesto comparativo 1 (¹³ Leu-motilina)	25	62,5 ± 0,0	4,53 ± 2,86	63,3 ± 36,6	2,8 ± 1,6
Compuesto comparativo 2 (MT139)	25	81,6 ± 3,0	9,30 ± 3,09	118,6 ± 41,0	4,1 ± 1,6
Compuesto 1 (MT095)	25	62,6 ± 2,6	9,09 ± 0,53	119,3 ± 15,0	5,3 ± 0,6
Compuesto 2 (MT114)	25	92,7 ± 3,4	26,60 ± 11,30	350,4 ± 146,6	10,4 ± 4,3
Compuesto 3 (MT116)	25	82,4 ± 1,6	24,60 ± 5,80	281,8 ± 24,0	9,5 ± 0,9
Compuesto 4 (MT124)	25	70,4 ± 9,9	14,61 ± 8,23	281,3 ± 201,7	11,0 ± 7,2
Compuesto 5 (MT126)	25	86,2 ± 0,0	14,81 ± 7,78	175,3 ± 90,7	5,7 ± 2,9
Compuesto 6 (MT140)	25	92,7 ± 3,4	34,22 ± 19,97	380,4 ± 191,5	11,5 ± 6,1
Compuesto 7 (MT141)	25	83,5 ± 4,7	17,20 ± 7,18	194,3 ± 47,9	6,4 ± 1,3
Compuesto 9 (MT115)	25	56,4 ± 1,5	8,99 ± 5,99	115,5 ± 64,2	5,7 ± 3,1
Compuesto 10 (MT125)	25	89,3 ± 0,0	6,10 ± 1,50	189,5 ± 25,5	5,9 ± 0,8
Compuesto 12 (MT154)	25	83,6 ± 5,6	30,09 ± 15,79	565,3 ± 341,1	18,7 ± 10,7
Compuesto 13 (MT155)	25	91,5 ± 1,9	18,42 ± 10,40	185,4 ± 48,5	5,6 ± 1,5

- 20 Como es evidente a partir de los datos mostrados en la Tabla 3, la biodisponibilidad (abreviada en lo sucesivo en el presente documento BD) del compuesto 1 (con la prolina sustituida por glicina como el aminoácido en la posición 21 de la motilina nativa; ²¹Pro-motilina; SEQ ID NO: 3) era de un 5,3 % tras la administración pulmonar a ratas, y este valor era mayor que la BD que se consiguió con la motilina nativa tras la administración pulmonar (3,3 %). El compuesto 2 (con la leucina sustituida por metionina como el aminoácido en la posición 13 de la motilina nativa, y con la prolina sustituida por el aminoácido en la posición 21; ¹³Leu-, ²¹Pro-motilina; SEQ ID NO: 4) tenía una BD del 10,4 % tras la administración pulmonar a ratas, una notable mejora con respecto al compuesto comparativo 1 (³Leu-motilina; SEQ ID NO: 16) (2,8 %). Aún es más, el compuesto 6 (-psi[CH₂NH]-enlace; ²¹Pro-motilina; SEQ ID NO: 8) tenía una BD del 11,5 % tras la administración pulmonar, una notable mejora con respecto al compuesto comparativo 2 (-psi[CH₂NH]-motilina; SEQ ID NO: 17) (4,1 %). En resumen, los compuestos 1-13, que eran derivados de la motilina con una sustitución de la prolina en la posición 21, tenían unos valores de BD del 5,3-18,7 %, siendo todos mejores con respecto a la BD de la motilina nativa (3,3 %). A partir de estos resultados se averiguó que la susceptibilidad de absorción tras la administración pulmonar mejora cuando se sustituye la prolina por el aminoácido en la posición 21 de la motilina nativa o de los compuestos peptídicos de tipo motilina.

- 35 Por lo tanto, cuando se administraron los compuestos 1-13, es decir, los derivados de la motilina con una sustitución de la prolina en la posición 21, por vía pulmonar a ratas, la eficacia de absorción en el cuerpo a través de la membrana mucosa mejoró tan notablemente (véase la Tabla 3) que se demostró que las concentraciones *in vivo* de los compuestos absorbidos se mantenían a unos niveles mayores durante un periodo más largo que con la motilina nativa.

- 40 Ejemplo comparativo 2: experimento farmacocinético con motilina nativa y un compuesto derivado de la motilina administrados por vía pulmonar en monos

En este ejemplo se administraron por vía intravenosa la motilina nativa y un compuesto derivado de la motilina a

monos y se midieron sus concentraciones plasmáticas.

- 5 Como animales de ensayo se sometieron monos cinomólogos macho de entre 8 y 9 años de edad (N = 1-2 por grupo) al siguiente experimento. Se disolvieron cada uno de la motilina nativa y el compuesto 2 en una solución de manitol al 5 % para preparar soluciones con una concentración de 100 µg/ml; las soluciones fueron administradas a los animales a una dosis de 0,1 ml/kg a través de la vena cefálica derecha por medio de una jeringa y una aguja (siendo ambos productos de TERUMO). Antes de la administración y 5, 10, 15, 20, 30 y 60 minutos después de la administración, se tomaron muestras de sangre a través de la vena cefálica izquierda.
- 10 A la muestra de sangre recogida se añadió inmediatamente una solución de EDTA al 10 % · 2 Na · 2 H₂O a una proporción en volumen de 1:100 y el plasma se separó mediante una centrifugación. El plasma se mezcló inmediatamente con una solución de 5.000 UI/ml de aprotinina a una proporción en volumen de 1:10 y se almacenó a -80 °C hasta su uso en la medición.
- 15 La medición de las concentraciones plasmáticas de la motilina nativa y del compuesto derivado de la motilina se llevó a cabo mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA) usando un anticuerpo anti-motilina. Más específicamente, después de añadir un anticuerpo anti-motilina a la muestra de plasma, se añadió [¹²⁵I-Tyr7] motilina para que tuviera lugar una reacción competitiva. Mediante la posterior adición de un anticuerpo secundario, se precipitó la unión de la motilina al anticuerpo anti-motilina, y después de la separación del sobrenadante, se midió la radioactividad en la fracción precipitada con un contador γ (producto de PerkinElmer).
- 20

25 El perfil obtenido de la concentración plasmática de la motilina nativa en plasma está representado en la FIG. 4. A partir de los perfiles obtenidos para las concentraciones plasmáticas de la motilina nativa y del compuesto derivado de la motilina, se calculó la concentración plasmática en el tiempo cero (C₀) y el área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas (AUC) como parámetros farmacocinéticos; el C₀ se determinó mediante una extrapolación, y el AUC mediante el método de los trapecios. Se calculó que los valores del C₀ y del AUC resultantes de la administración intravenosa de la motilina nativa a una dosis de 10 µg/kg eran de 233 ng/ml y de 786 ng*min/ml, respectivamente, y los equivalentes para el compuesto 2 eran de 273 ng/ml y de 926 ng*min/ml.

30 Ejemplo 5: experimento farmacocinético con motilina nativa y un compuesto derivado de la motilina administrados por vía intranasal en monos

35 Este ejemplo se llevó a cabo con el fin de medir mediante un RIA los cambios que se produjeron en monos en términos de las concentraciones plasmáticas de la motilina nativa y de un compuesto derivado de la motilina administrados por vía transnasal.

40 En el experimento se usaron monos cinomólogos macho de entre 10 y 11 años de edad. Se mezclaron la motilina nativa o el compuesto 2 y celulosa microcristalina a una proporción de 1:40 para preparar preparaciones intranasales, porciones de 20 mg de las cuales se introdujeron en cápsulas de gelatina. Cada cápsula fue administrada en la cavidad nasal derecha de cada animal por medio de un dispositivo de administración intranasal (producto de Hitachi Automotive Systems, Ltd.). Antes de la administración y 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 y 180 minutos después de la administración, se recogieron muestras de sangre a través de la vena cefálica. Las muestras de sangre recogidas se trataron como en el Ejemplo comparativo 2 para separar el plasma, y las concentraciones plasmáticas de la motilina nativa y del compuesto derivado de la motilina se midieron mediante un RIA. En la medición se usaron los respectivos derivados como sustancias patrones para la construcción de las curvas de calibración para la determinación de los niveles plasmáticos.

45

50 Los perfiles de las concentraciones plasmáticas de la motilina nativa y del compuesto 2 (MT114) en los monos después de la administración intranasal se muestran en la FIG. 5. Como también es evidente a partir de la FIG. 5, en comparación con el perfil de la concentración plasmática de la motilina después de la administración intranasal de la motilina nativa a los monos, la concentración plasmática del compuesto 2 (MT114) después de la administración intranasal a los monos tenía un nivel de pico elevado, lo que demuestra que el compuesto podía mantener una mayor concentración *in vivo* durante un periodo de tiempo más largo que la motilina nativa.

55 Sobre la base de los perfiles plasmáticos de la motilina nativa y del compuesto derivado de la motilina obtenidos mediante las pruebas descritas anteriormente, se calcularon la concentración plasmática máxima (C_{máx}) y el área bajo la curva para las concentraciones plasmáticas (AUC) como parámetros farmacocinéticos; la C_{máx} se determinó a partir de los valores observados, y el AUC mediante el método de los trapecios. Usando estos valores se calculó la biodisponibilidad (BD (%)) mediante la siguiente ecuación:

60

$$BD (\%) - [(AUC/Dosis) / (AUC (iv) / Dosis (iv))] \times 100$$

AUC: AUC (ng*min/ml) después de la administración intranasal

Dosis: dosis (mg/kg) en la administración intranasal

65 AUC (iv): AUC (ng*min/ml) después de la administración intravenosa de cada compuesto

Dosis (iv): dosis (mg/kg) en la administración intravenosa de cada compuesto.

Los parámetros farmacocinéticos de la motilina nativa y del compuesto derivado de la motilina se muestran en la siguiente Tabla 4.

5 [Tabla 4]

Tabla 4: parámetros farmacocinéticos de la motilina nativa y de un compuesto derivado de la motilina administrados por vía intranasal en monos (media para N = 1-2)

Nombre del compuesto	Dosis		C _{máx} (ng/ml)	AUC (ng*min/ml)	BD (%)
	(mg/mono)	(mg/kg)			
Motilina nativa	523	85,0	13,6	241	3,6
Compuesto 2 (MT 114)	540	80,6	23,5	361	5,1

10 Como es evidente a partir de los datos mostrados en la Tabla 4, la biodisponibilidad (abreviada en lo sucesivo en el presente documento BD) del compuesto 2 era del 5,1 % tras la administración intranasal en monos, y este valor era mayor que la BD que se consiguió con la motilina nativa tras la administración intranasal (3,6 %). Por lo tanto, cuando se administraba por vía intranasal el compuesto 2 o un derivado de la motilina con una sustitución de la prolina en la posición 21 a monos, la eficacia de absorción en el cuerpo a través de la membrana mucosa mejoraba tan notablemente que se demostraba que la concentración *in vivo* del compuesto absorbido se mantenía a un nivel mayor durante un periodo más largo que con la motilina nativa.

Aplicación industrial

20 La presente divulgación se refiere a nuevos compuestos peptídicos de tipo motilina. Los compuestos peptídicos de tipo motilina de la presente divulgación o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos tienen una eficaz actividad estimulante de la motilidad gastrointestinal y una mayor susceptibilidad de absorción tras una administración transmucosa, por lo que pueden ser usados para el tratamiento de enfermedades causadas por anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal (por ejemplo, afecciones caracterizadas por una caída en el valor basal de la actividad de la motilidad gastrointestinal). Algunas enfermedades causadas por anomalías funcionales en el tracto gastrointestinal incluyen afecciones tales como dispepsia funcional, gastroparesia diabética, enfermedad por reflujo gastroesofágico, síndrome de intestino irritable, proliferación de pequeñas bacterias intestinales, pseudo-obstrucción del colon, íleo paralítico, pseudo-obstrucción intestinal idiopática crónica e íleo postoperatorio. Los agonistas peptídicos convencionales de la motilina, incluyendo la motilina nativa, han sido aplicables únicamente mediante una inyección intravenosa directa, pero los compuestos de la presente divulgación pueden ser administrados a través de la vía transmucosa y de otras vías no intravenosas, y pueden reducir la carga a los pacientes. Por lo tanto, la presente divulgación ofrece una gran utilidad industrial sobre la técnica anterior.

Texto libre de la lista de secuencias

35 SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de la motilina humana.
 SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de un análogo de la motilina.
 SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 1 (MT095).
 SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 2 (MT114).
 40 SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 3 (MT116).
 SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 4 (MT124).
 SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 5 (MT126).
 SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 6 (MT140).
 SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 7 (MT141).
 45 SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 8 (MT107).
 SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 9 (MT115).
 SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 10 (MT125).
 SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 11 (MT128).
 SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 12 (MT154).
 50 SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos del compuesto 13 (MT155).
 SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos del compuesto comparativo 1 (¹³Leu-motilina).
 SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos del compuesto comparativo 2 (MT139).

LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED.
 <120> Compuestos peptídicos homólogos de la motilina.
 60 <130> 10070

<150> JP 2009-177107
 <151> 29-07-2009

<160> 17

5 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
 <211> 22
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Asn Lys Gly Gln
20

15 <210> 2
 <211> 22
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de los homólogos de la motilina.

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> un aminoácido aromático o un aminoácido aromático heterocíclico

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> prolina o sarcosina (Sar; o N-metilglicina, MeGly)

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> ácido aspártico o ácido glutámico

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> metionina o leucina

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> prolina o asparragina

50 <400> 2

Xaa Val Xaa Ile Phe Thr Tyr Gly Xaa Leu Gln Arg Xaa Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Xaa Lys Pro Gln
20

<210> 3

<211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 1 (MT095).

<400> 3

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys
1 5 10 15

10 **Glu Arg Asn Lys Pro Gln**
20

<210> 4
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 2 (MT114).

20 <400> 4

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Asn Lys Pro Gln
20

<210> 5
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 3 (MT116).

<400> 5

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Asp Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Pro Lys Pro Gln
20

35 <210> 6
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 4 (MT124).

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> beta-homofenilglicina (Phg(C#CH2))

ES 2 653 523 T3

<400> 6

Xaa Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Pro Lys Pro Gln
20

5 <210> 7
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 5 (MT126).

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> beta-homofenilglicina (Phg(C#CH2))

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> sarcosina (Sar; o N-metilglicina, MeGly)

<400> 7

Xaa Val Xaa Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Pro Lys Pro Gln
20

25 <210> 8
<211> 22
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 6 (MT140).

35 <400> 8

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Asn Lys Pro Gln
20

40 <210> 9
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 7 (MT141).

<400> 9

ES 2 653 523 T3

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Asn Lys Pro Gln
20

5 <210> 10
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 8 (MT107).
<400> 10

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Pro Lys Pro Gln
20

15 <210> 11
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 9 (MT115).
<400> 11

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Pro Lys Pro Gln
20

25 <210> 12
<211> 22
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 10 (MT125).

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> beta-homofenilglicina (Phg(C#CH2))

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> sarcosina (Sar; o N-metilglicina, MeGly)

45 <400> 12

ES 2 653 523 T3

Xaa Val Xaa Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Pro Lys Pro Gln
20

5 <210> 13
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 11 (MT128).

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> acetilnaftilalanina (Ac-Nal)

<400> 13

Xaa Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Asn Lys Pro Gln
20

20 <210> 14
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 12 (MT154).

<400> 14

Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Asp Leu Gln Arg Leu Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Pro Lys Pro Gln
20

30 <210> 15
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos del Compuesto 13 (MT155).

40 <400> 15

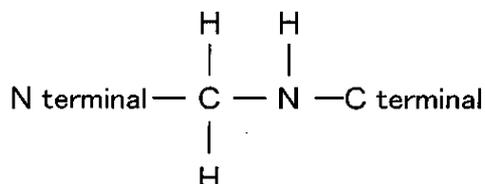
Phe Val Pro Ile Phe Thr Tyr Gly Asp Leu Gln Arg Met Gln Glu Lys
1 5 10 15

Glu Arg Pro Lys Pro Gln
20

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende la secuencia representada por la siguiente fórmula general 1:

- 5 X1 Val X2 Ile Phe Thr Tyr Gly X3 Leu Gln Arg X4 Gln Glu Lys Glu Arg X5 Lys Pro Gln (fórmula 1)
[en la que todos los enlaces entre aminoácidos, excepto el enlace X1-Val, son enlaces amida;
el enlace X1-Val es un enlace amida o un enlace representado por la siguiente fórmula 2



(fórmula 2)

- 10 X1 es fenilalanina, β -homofenilglicina o acetilnaftilalanina;
X2 es prolina o sarcosina;
X3 es ácido glutámico o ácido aspártico;
X4 es metionina o leucina;
X5 es asparragina o prolina]
- 15 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos,
en el que el compuesto tiene una actividad estimulante de tipo motilina de la motilidad gastrointestinal y muestra
una mayor eficacia de absorción tras una administración transmucosa en comparación con la motilina nativa.
- 20 2. Un compuesto según la reivindicación 1, que está representado por la secuencia seleccionada entre el grupo que
consiste en las SEQ ID NOS: 3 a 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25 3. Una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad asociada con una anomalía funcional en el
tracto gastrointestinal, que comprende el compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según una
cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
- 30 4. La composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que la enfermedad asociada con una anomalía
funcional en el tracto gastrointestinal se selecciona entre el grupo que consiste en dispepsia funcional, gastroparesia
diabética, enfermedad por reflujo gastroesofágico, síndrome de intestino irritable, proliferación de pequeñas
bacterias intestinales, pseudo-obstrucción del colon, íleo paralítico, pseudo-obstrucción intestinal idiopática crónica,
e íleo postoperatorio.
5. La composición farmacéutica según la reivindicación 3 o 4 que está destinada a una administración transmucosa.
- 35 6. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que la administración transmucosa es una
administración pulmonar o intranasal.

FIG. 1

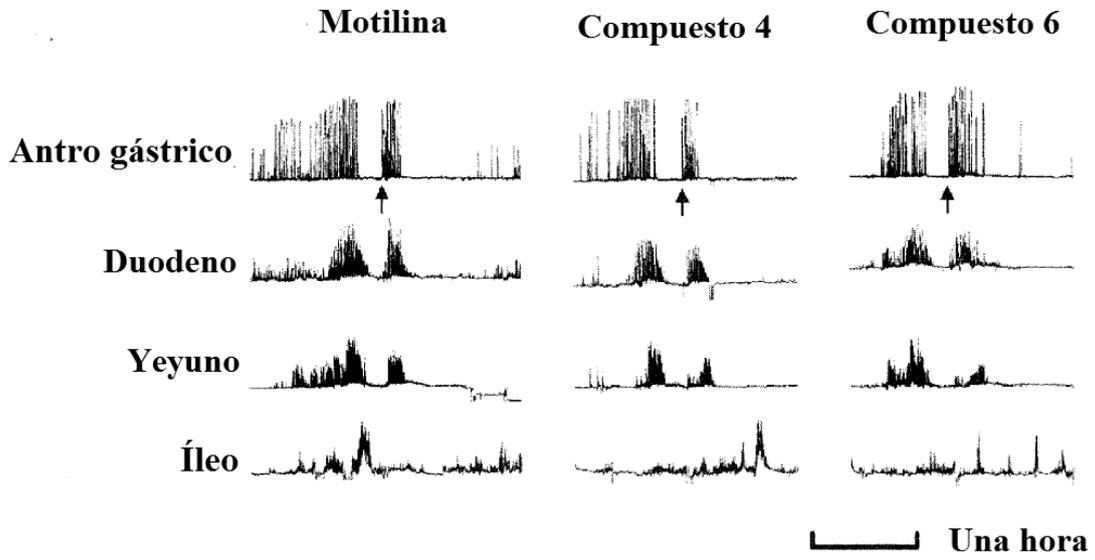


FIG. 2

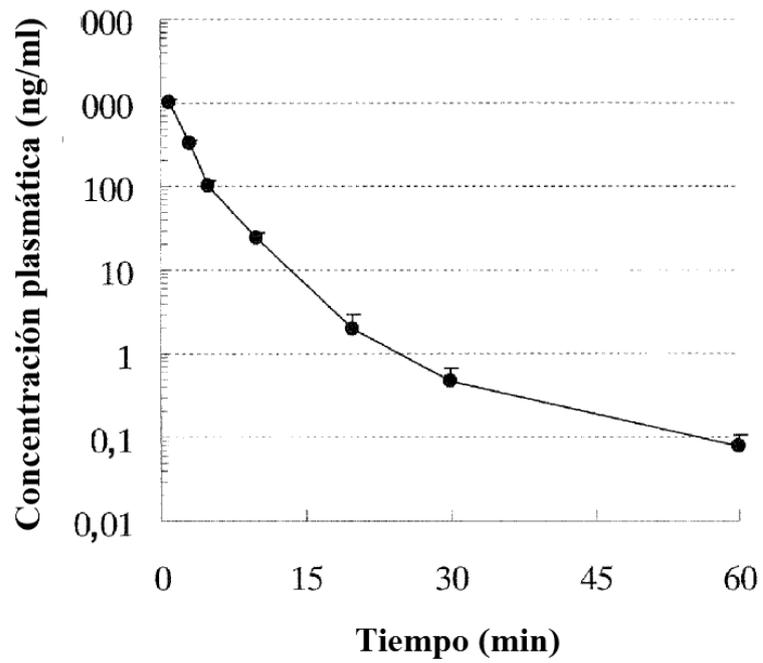


FIG. 3

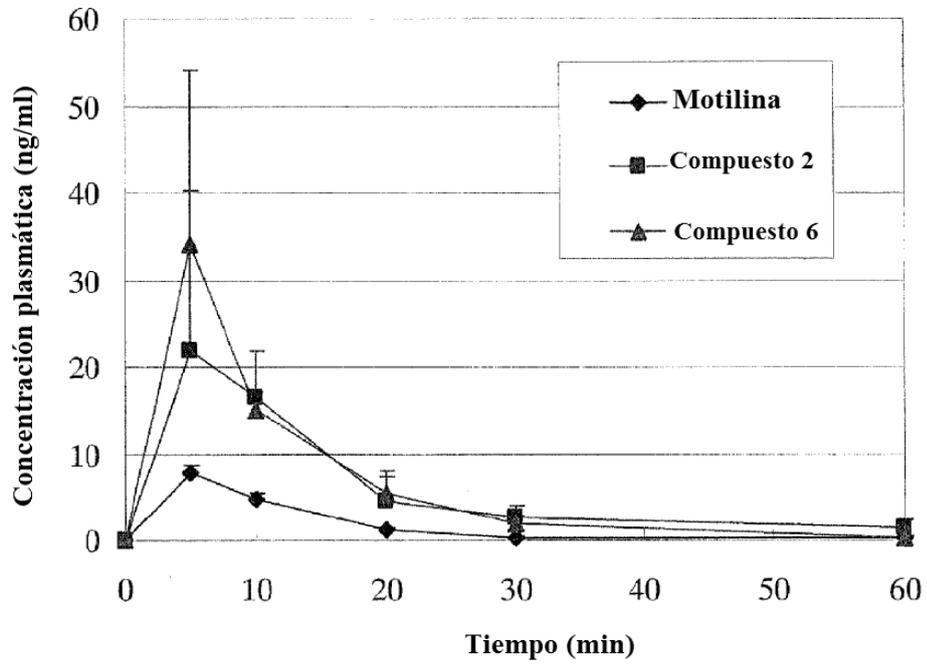


FIG. 4

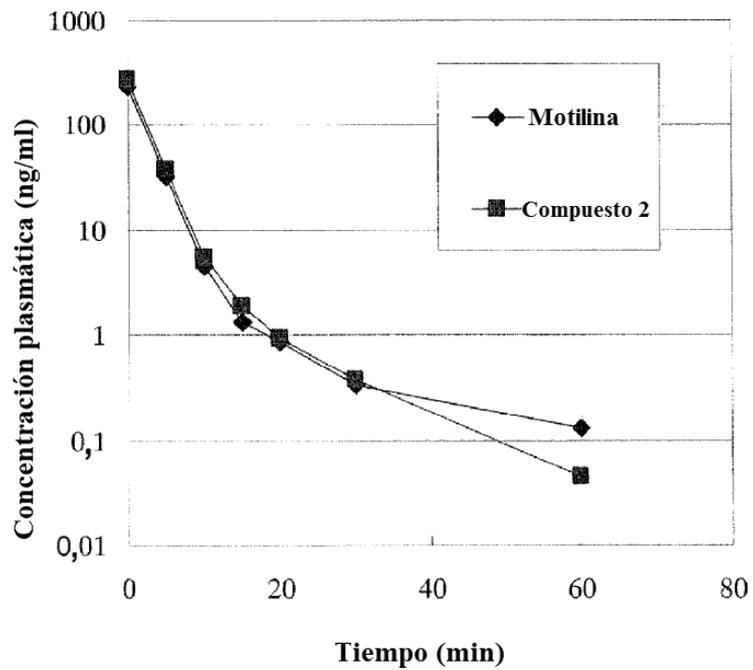


FIG. 5

