(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 710 948**

(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 14171762 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018** **EP 2818181**

(54) Título: **Composiciones y usos médicos de las mismas**

(30) Prioridad:

08.01.2007 US 879033 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.04.2019

(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:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 710 948 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y usos médicos de las mismas

Campo de la invención

Esta invención proporciona composiciones para uso en el tratamiento de la hipoglucemia posprandial.

Antecedentes de la invención

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 (K_{ATP} HI), con muchos pacientes que requieren una pancreatectomía casi total para controlar la hipoglucemia, lo que lleva a largas estancias hospitalarias y a complicaciones potencialmente mortales.

La hipoglucemia posprandial es una complicación frecuente en la funduplicatura de Nissen (por ejemplo, en niños), un procedimiento que se lleva a cabo comúnmente para tratar reflujo gastroesofágico severo. Hasta un 30 % de los pacientes que se están sometiendo a este proceso desarrollan el síndrome de Dumping. El síndrome de Dumping se caracteriza por síntomas tempranos o “dumping temprano” debido a los cambios de líquido provocados por la carga osmótica en el intestino delgado y el "dumping tardío" o hipoglucemia posprandial. La hipoglucemia posprandial también puede ser causada por una cirugía de bypass gástrico para la obesidad.

Se necesitan con urgencia tratamientos eficaces para el HI congénito y la hipoglucemia posprandial.

Sumario de la invención

Esta invención proporciona un antagonista del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) para uso en el tratamiento de la hipoglucemia posprandial, en donde dicho antagonista es el péptido, presentado en la SEQ ID N.º 1. En una realización, la hipoglucemia posprandial se asocia con una cirugía de bypass gástrico o con una funduplicatura de Nissen. En una realización, el antagonista se administra subcutáneamente.

Breve descripción de las figuras

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:

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;

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 de hipoglucemia posprandial, en donde dicho antagonista es el péptido presentado en la SEQ ID Nº. 1. En una realización, la hipoglucemia posprandial se asocia con una cirugía de bypass gástrico o con una funduplicatura de Nissen.

Como se describe en la presente memoria, 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, 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. También se describe que la relación elevada de insulina/glucosa se disminuye con la exendina-(9-39), lo que indica que 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.

En una realización, la exendina-(9-39) o sus análogos y fragmentos descritos en la presente memoria, suprimen la secreción de insulina estimulada por aminoácidos. En otra realización la exendina-(9-39) o sus análogos y fragmentos descritos en la presente memoria, 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 análogos y fragmentos descritos en la presente memoria, 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.

En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1R suprime la secreción de insulina por el sujeto.

Como se indica en la presente 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 solicitud describe que la exendina-(9-39) y otro antagonista GLP-1R son eficaces en el tratamiento de hiperinsulinismo congénito.

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 análogos y fragmentos descrita en la presente memoria, 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).

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.

La presente solicitud describe también un método para tratar a un sujeto con una hipoglucemia posprandial, que comprende la etapa de administrar al sujeto un antagonista del receptor de GLP-1, tratando así a un sujeto con una hipoglicemia posprandial.

La presente solicitud también describe un método para reducir una incidencia de una hipoglucemia posprandial en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un antagonista de GLP-1R, reduciendo así la incidencia de una hipoglucemia posprandial en un sujeto.

La presente solicitud también describe un método para mitigar una hipoglucemia posprandial en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un antagonista de GLP-1R, mitigando así una hipoglucemia posprandial en un sujeto.

La presente solicitud también describe un método para inhibir el desarrollo de una hipoglucemia posprandial en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto un antagonista de GLP-1R, inhibiendo así un desarrollo de una hipoglucemia posprandial en un sujeto.

La presente solicitud también describe un método para disminuir el requerimiento de glucosa para mantener la euglucemia de un sujeto con hipoglucemia posprandial, que comprende la etapa de administrar al sujeto un antagonista de GLP-1R, disminuyendo así el requerimiento de glucosa para mantener la euglucemia. de un sujeto con hipoglucemia posprandial.

En otra realización, el antagonista de GLP-1R suprime la secreción de insulina por parte del sujeto.

Como se describe en la presente memoria, la hipoglucemia posprandial después de la funduplicatura de Nissen se caracterizan por niveles altos de insulina y GLP-1 después de la carga de glucosa oral. Además, la exendina-(9-39) antagoniza la señalización de GLP-1. Por lo tanto, la presente solicitud describe que la exendina-(9-39) y otros antagonistas de GLP-1R son eficaces en el tratamiento de la hipoglucemia posprandial (por ejemplo, en respuesta a la funduplicatura de Nissen o a la cirugía de bypass gástrico).

La hipoglucemia posprandial tratada por la presente invención, se asocia, en otra realización, con una funduplicatura de Nissen. En otra realización, la hipoglucemia posprandial ocurre después de una funduplicatura de Nissen.

En otra realización, la hipoglucemia posprandial se asocia con una cirugía de bypass gástrico. En otra realización, la hipoglucemia posprandial ocurre después de una cirugía de bypass gástrico.

En otra realización, el antagonista de GLP-1R se administra después del diagnóstico de la hipoglucemia posprandial.

En otra realización, el antagonista de GLP-1R se administra después de una cirugía de bypass gástrico. En otra realización, el antagonista de GLP-1R se administra durante de una cirugía de bypass gástrico. En otra realización, el antagonista de GLP-1R se administra antes de una cirugía de bypass gástrico.

En otra realización, el antagonista de GLP-1R se administra después de una funduplicatura de Nissen. En otra realización, el antagonista de GLP-1R se administra durante de una funduplicatura de Nissen. En otra realización, el antagonista de GLP-1R se administra antes de una funduplicatura de Nissen.

El antagonista de GLP-1R utilizado en la presente invención, es, en otra realización, un análogo de GLP-1. En otra realización, el análogo es un antagonista de GLP-1R.

En otra realización, el análogo es resistente a la escisión por una dipeptidilpeptidasa-IV (DPPIV). En otra realización, el análogo muestra una vida media biológica prolongada con respecto a GLP-1- En otra realización, el análogo es resistente a la degradación por DPPIV.

“Resistente a la escisión” se refiere, en otra realización, a la resistencia a la proteólisis por la DPPIV con respecto a GLP-1. En otra realización, el término se refiere a la resistencia con respecto a un fragmento de GLP-1. En otra realización, el término se refiere a la resistencia a la proteólisis por otra dipeptidilpeptidasa. En otra realización, la

dipeptidilpeptidasa es DPP10 (proteína 3 relacionada con dipeptidilpeptidasa-IV). En otra realización, la dipeptidilpeptidasa es DPP7. En otra realización, la dipeptidilpeptidasa es DPP6. En otra realización, la dipeptidilpeptidasa es DPP3. En otra realización, la dipeptidilpeptidasa es DPP9.

En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1R utilizado en la presente invención presenta una mejora en una propiedad biológica deseable con respecto al 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-1R. En otra realización, la propiedad biológica que se mejora es la potencia del antagonismo del receptor de GLP-1R.

En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1R 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 proteolisis. 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-1R. En otra realización, la propiedad biológica que se mejora es la potencia del antagonismo del receptor de GLP-1R.

En otra realización, el antagonista es un péptido de exendina (9-39) (Ex9-39). En otra realización, el péptido se conoce también como "exendina-3". En esta invención, el péptido tiene una secuencia presentada en la SEQ ID No: 1. En otra realización, el fragmento es un antagonista de un receptor de GLP-1R. En otra realización, el fragmento presenta una semivida biológica prolongada con respecto al 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.

En otra realización, el antagonista es exendina (9-39). En otra realización, el péptido exendina9-39 tiene la secuencia: DLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID N.º: 1).

En otra realización, un antagonista del receptor de GLP-1R es un compuesto mimético de Ex9-39. En otra realización, el compuesto mimético presenta resistencia a la proteasa con respecto al GLP-1. En otra realización, el compuesto mimético es resistente a la degradación por DPPIV.

En otra realización, uno o más de los extremos terminales del compuesto mimético 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 C_1-C_5 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 ($-NH_2$), 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, los compuestos miméticos 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 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.

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): 1809-12, 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.

En otra realización, el mimético de GLP-1 utilizado en la presente invención muestra una mejora en una propiedad biológica deseable con respecto a GLP-1. En otra realización, el mimético muestra una mejora en una propiedad biológica deseable en relación a un fragmento de GLP-1 (por ejemplo, el fragmento de GLP-1 sobre el que se modeló el mimético). En otra realización, la propiedad biológica es una vida media biológica mejorada. En otra realización, la propiedad biológica es una afinidad mejorada para GLP-1R. En otra realización, la propiedad biológica es la disponibilidad oral mejorada. En otra realización, la propiedad biológica es una selectividad mejorada para inhibir la secreción de insulina. En otra realización, la propiedad biológica es una potencia mejorada para el antagonismo de GLP-1R.

En otra realización, el sujeto tratado según 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 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. 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.

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.

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.

En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1R se administra por perfusión. En otra realización, la administración comprende el uso de una bomba.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el antagonista del receptor de GLP-1R 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-tumoral.

En otra realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se administran 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, el ingrediente activo se formula en una cápsula. De acuerdo con esta realización, las composiciones comprenden, además del compuesto activo y el vehículo o diluyente inerte, una cápsula de gelatina dura.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran 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.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas se administran 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-1R 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.

En otra realización, la composición farmacéutica se administra 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-1R durante un período de tiempo.

En otra realización, el compuesto activo se administra en una vesícula, por ejemplo un liposoma.

En otras realizaciones, los vehículos o diluyentes usados en los métodos de 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.

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.

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 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.

En otras realizaciones, las composiciones comprenden además aglutinantes (por ejemplo goma arábiga, 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 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), 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.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria son composiciones de liberación controlada, esto es, composiciones en las que el antagonista del receptor de GLP-1R se libera durante un período de tiempo después de la administración. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen la

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-1R se libera inmediatamente después de la administración.

En otra realización, la composición farmacéutica se administra en un sistema de liberación controlada. En otra 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 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 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-1R 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-1R 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-1R 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 60-1000 nmol/kg/día. En otra realización, la dosis es 100-150 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.

En otra realización, se describe en la presente memoria, un kit que comprende un compuesto o composición utilizado en un tratamiento 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-1R 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-1R *in vivo*.

"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-1R 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. En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1R se transporta en el torrente sanguíneo del sujeto hasta la célula diana del sujeto. En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1R se transporta por difusión hasta la célula diana del sujeto. En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1R se transporta por transporte activo hasta la célula diana del sujeto. En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1R se administra al sujeto de tal manera que se pone directamente en contacto con la célula diana del sujeto.

El tejido diana de las composiciones para su uso en 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-1R.

La presente solicitud describe un método para tratar cualquier enfermedad, desorden, síntoma, o efecto secundario asociado con la hipoglucemia posprandial, comprendiendo el método la administración de un antagonista GLP-1R.

En otra realización, el antagonista del receptor de GLP-1R 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 una hipoglucemia posprandial.

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 C57B1/6. 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 Institutional 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 estreptomicina. Se incubaron los islotes a 37 ºC en un incubador con 5 % de CO_2 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, $NaHCO_3$ 24 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 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 O_2 y 5 % de CO_2 y se mantuvieron a 37 ºC. 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 ºC. Se perfundieron después los islotes con tampón Krebs-Ringer-bicarbonato con 0,25 % de seroalbúmina bovina a 37 ºC 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, $p = 0,00000003$) (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, $p < 0,01$).

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 ± 4,2	221 ± 22
Exendina-(9-39)100 nM	20,5 ± 2,3[a]	126 ± 12[a]
AAM 4 nM	20,9 ± 4,4[a]	389 ± 17 [bd]
Exendina-(9-39) 100 nM/ AAM 4 nM	52,5 ± 9,4[c]	219 ± 14

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

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.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA

<120> COMPOSICIONES Y USOS MÉDICOS DE LAS MISMAS

<130> P-9442-EP1

<150> EP 08713063.9
<151> 08-01-2008

<150> US 60/879,033
<151> 08-01-2007

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 31
<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<220>
<221> MOD-RES
<222> (31)..(31)
<223> AMIDACIÓN

<400> 1

```
Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu
1               5                   10                  15


Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
            20                  25                  30
```

<210> 2
<211> 87
<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<400> 2

```
Met Lys Ile Ile Leu Trp Leu Cys Val Phe Gly Leu Phe Leu Ala Thr
1               5                   10                  15


Leu Phe Pro Val Ser Trp Gln Met Pro Val Glu Ser Gly Leu Ser Ser
            20                  25                  30


Glu Asp Ser Ala Ser Ser Glu Ser Phe Ala Ser Lys Ile Lys Arg His
        35                  40                  45


Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
    50                  55                  60

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser
65                  70                  75                  80


Gly Ala Pro Pro Pro Ser Gly
                85
```

<210> 3
<211> 40

<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<400> 3

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Gln Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser
20 25 30

Gly Ala Pro Pro Pro Ser Asn His
35 40

<210> 4
<211> 41
<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<400> 4

Lys Arg His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met
1 5 10 15

Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly
20 25 30

Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35 40

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<400> 5
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 6
<211> 30
<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<400> 6
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Lys Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 7
<211> 41
<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<400> 7

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Asn His
35 40

<210> 8
<211> 40
<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<400> 8

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Glu Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
1 5 10 15

Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser
20 25 30

Gly Ala Pro Pro Pro Ser Asn His
35 40

<210> 9
<211> 30
<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<400> 9

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25 30
<210> 10
<211> 39
<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> AMIDACIÓN

<400> 10

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gly Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista del receptor del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) para uso en el tratamiento de la hipoglucemia posprandial, en donde dicho antagonista es el péptido presentado en la SEQ ID N.º 1.

2. Un antagonista para uso según la reivindicación 1, en donde la hipoglucemia posprandial se asocia con una cirugía de bypass gástrico o con una funduplicatura de Nissen.

3. Un antagonista para uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el antagonista se administra subcutáneamente.

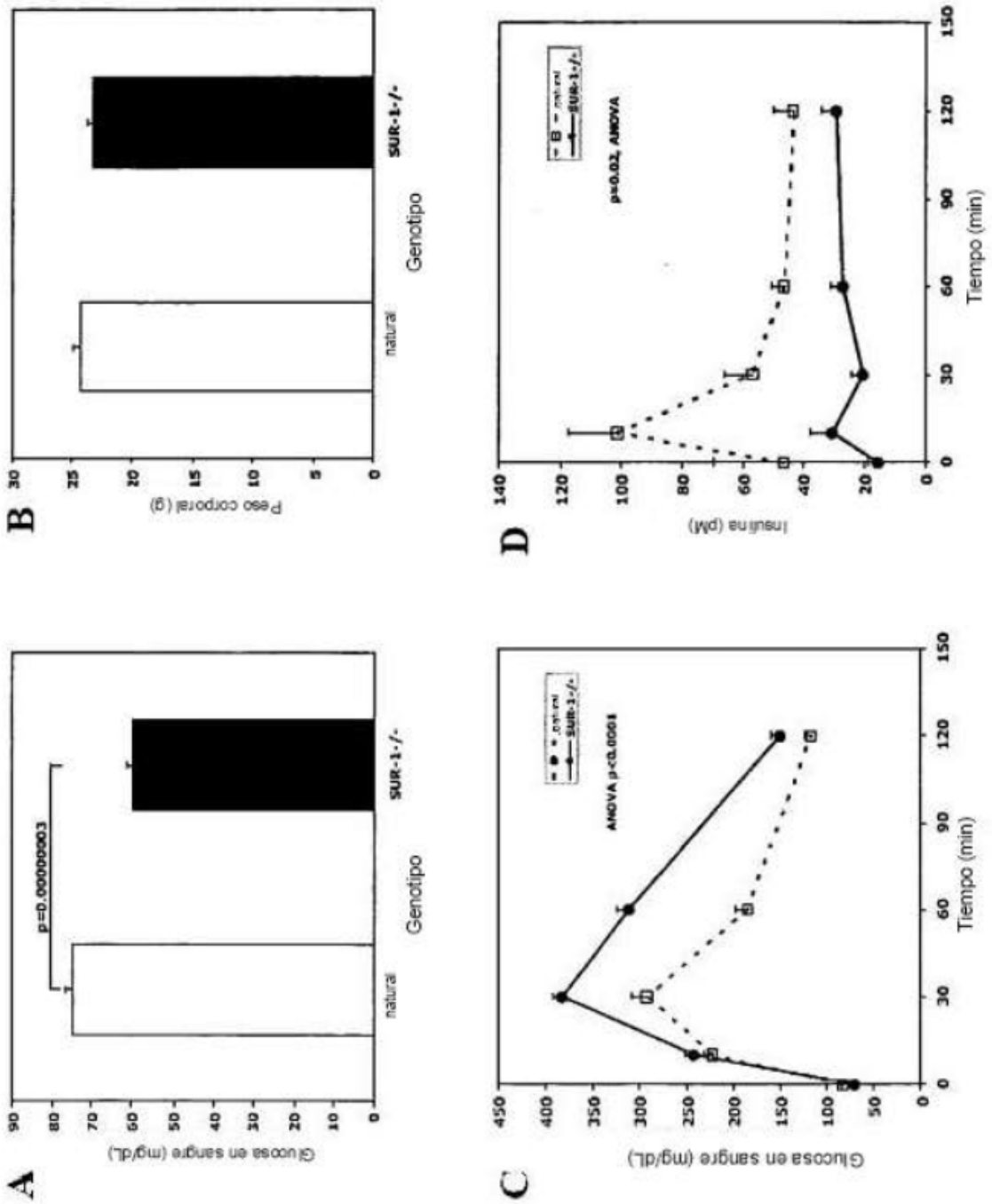
A
Glucosa en sangre (mg/dL)
p=0.00000003
natural
SUR-1-/-
Genotipo
B
Peso corporal (g)
natural
SUR-1-/-
Genotipo
C
Glucosa en sangre (mg/dL)
ANOVA p<0.0001
Tiempo (min)
D
Insulina (pM)
p=0.02, ANOVA
Tiempo (min)

Figura 1

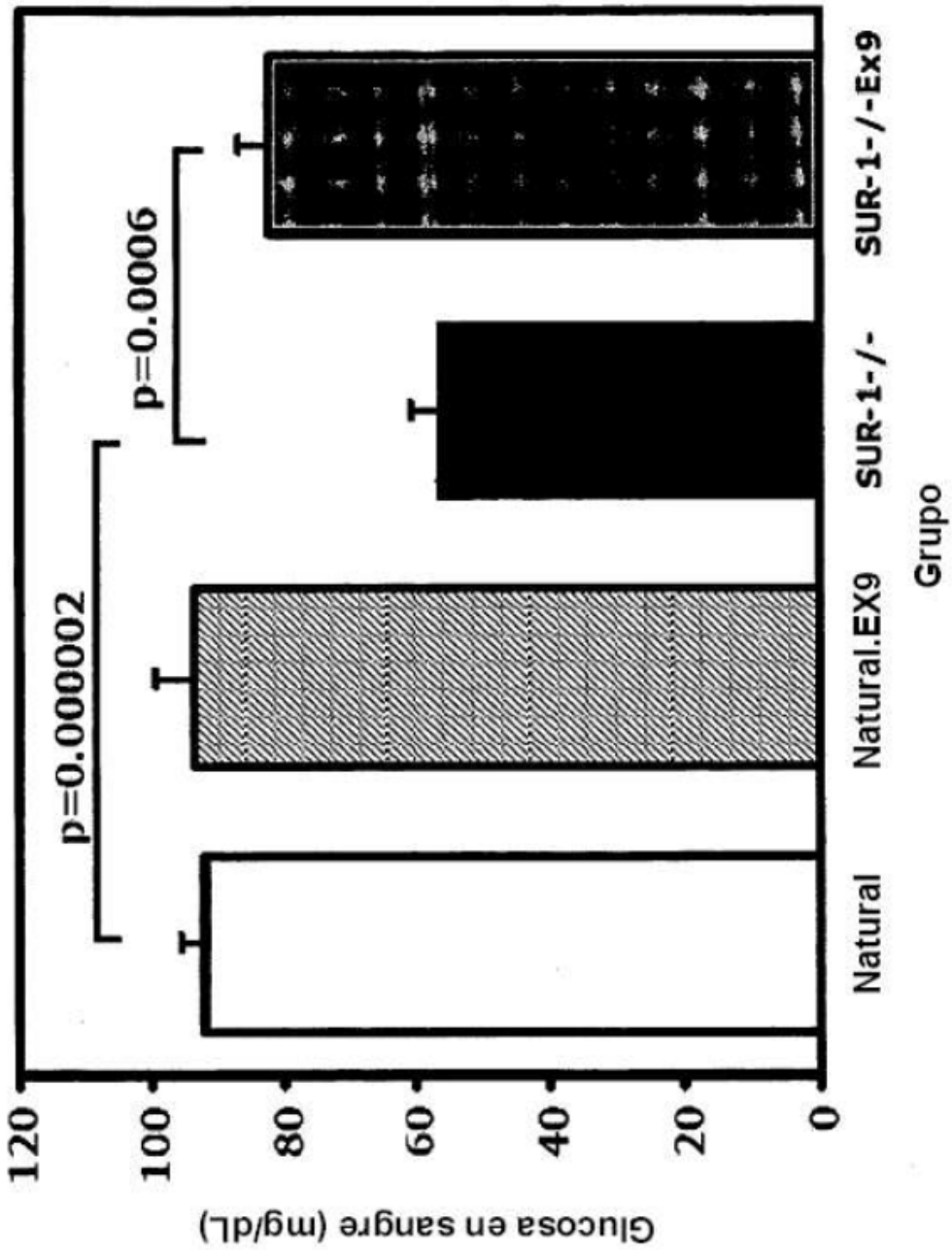
Glucosa en sangre (mg/dL)
120
100
80
60
40
20
0
p=0.000002
p=0.0006
Natural
Natural.EX9
SUR-1-/-
SUR-1-/-Ex9
Grupo

Figura 2

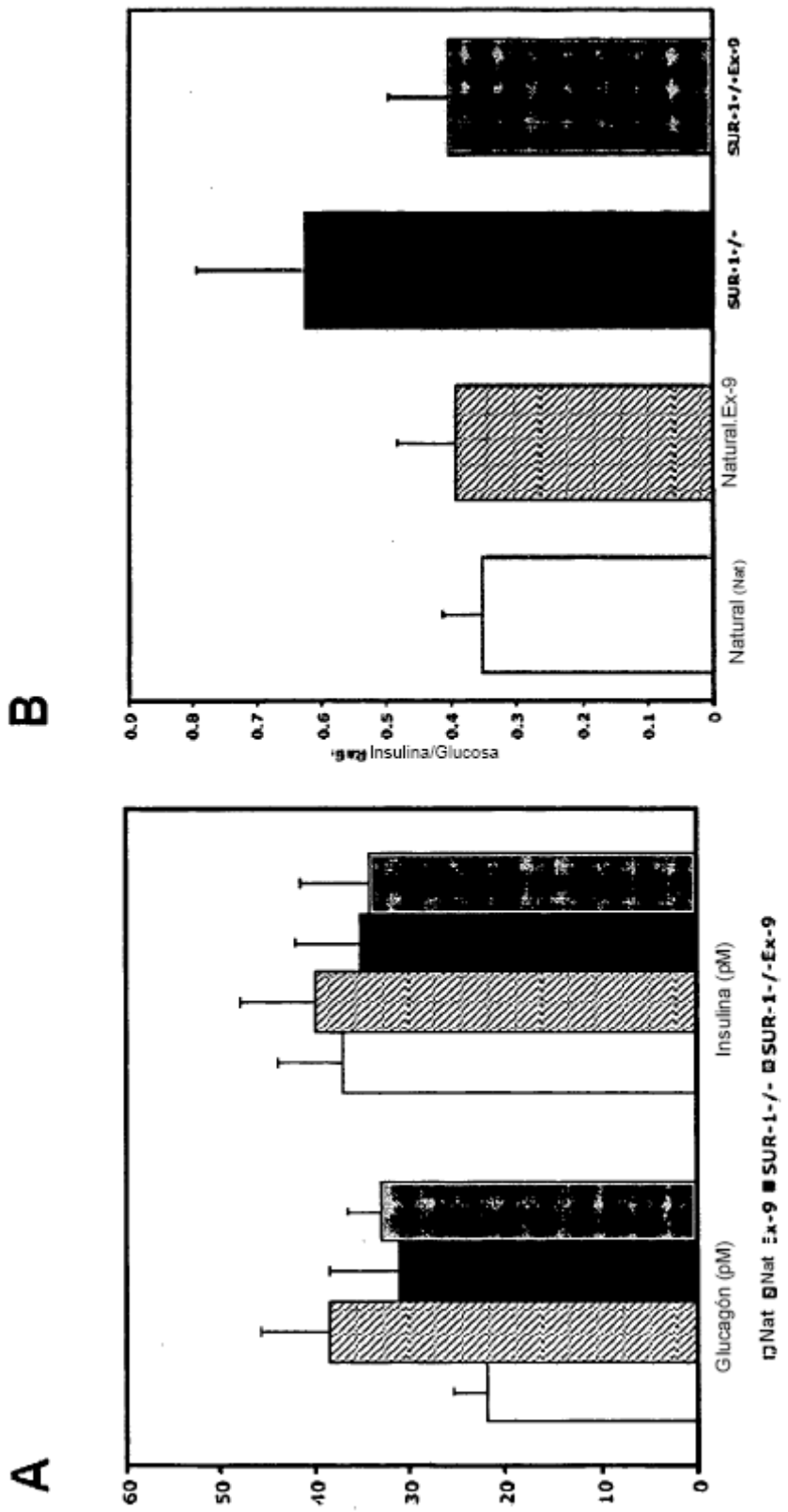
A
B
60
50
40
30
20
10
0
Glucagón (pM)
Insulina (pM)
Nat
Ex-9
SUR-1-/-
SUR-1-/-Ex-9
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Insulina/Glucosa
Natural (Nat)
Natural.Ex-9
SUR-1-/-
SUR-1-/-Ex-9

Figura 3

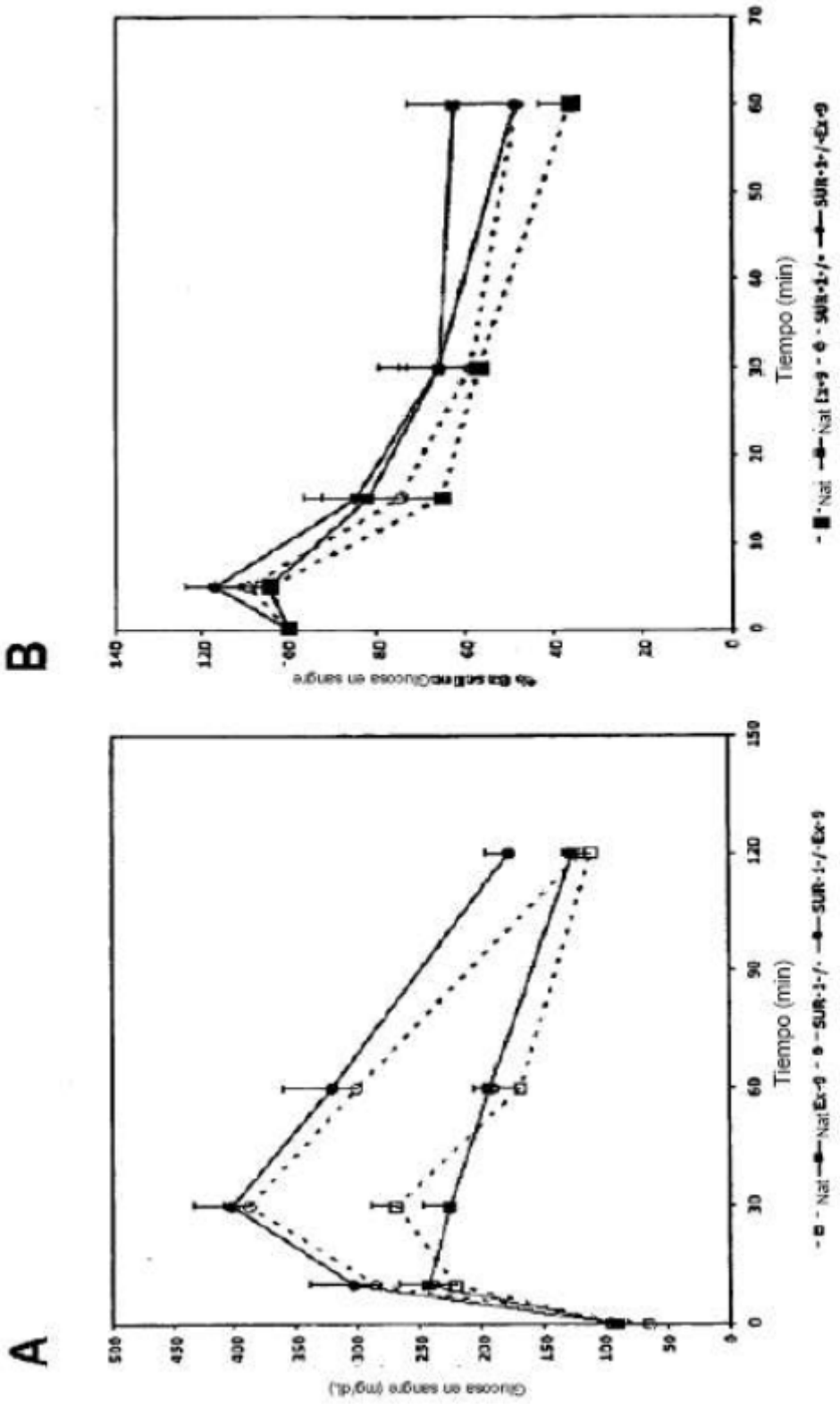
A
B
Glucosa en sangre (mg/dL)
Tiempo (min)
Tiempo (min)
Nat
Nat Ex-9
SUR-1-/-
SUR-1-/-Ex-9

Figura 4

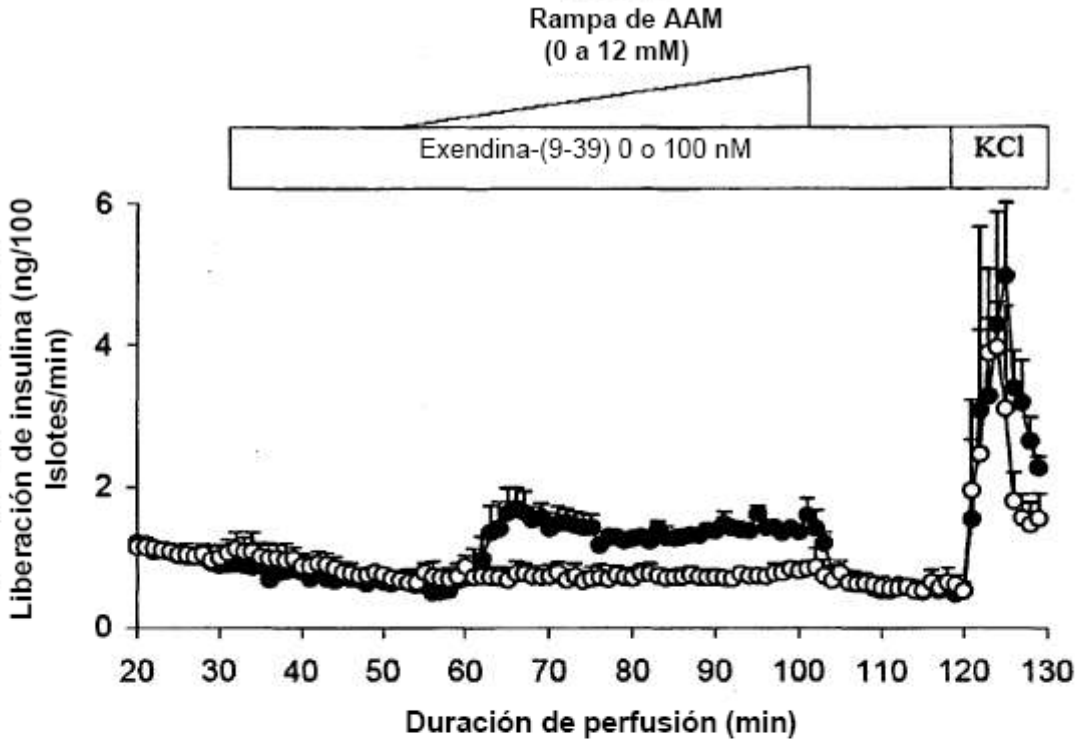

Figura 5

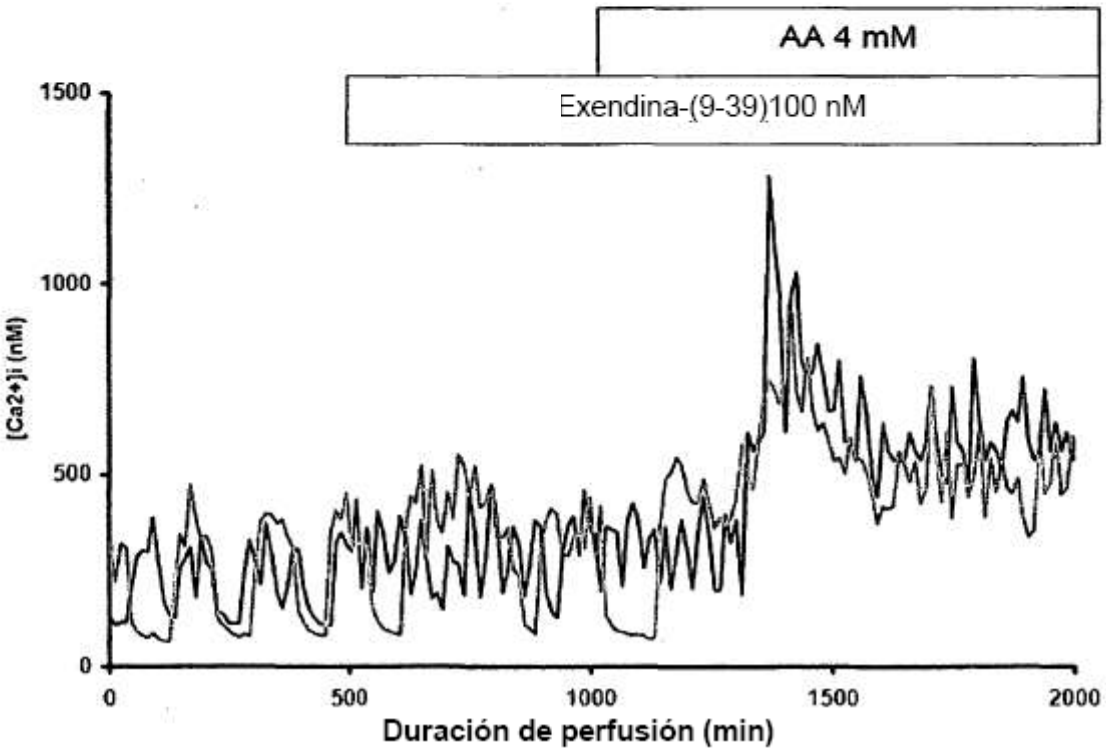

Figura 6

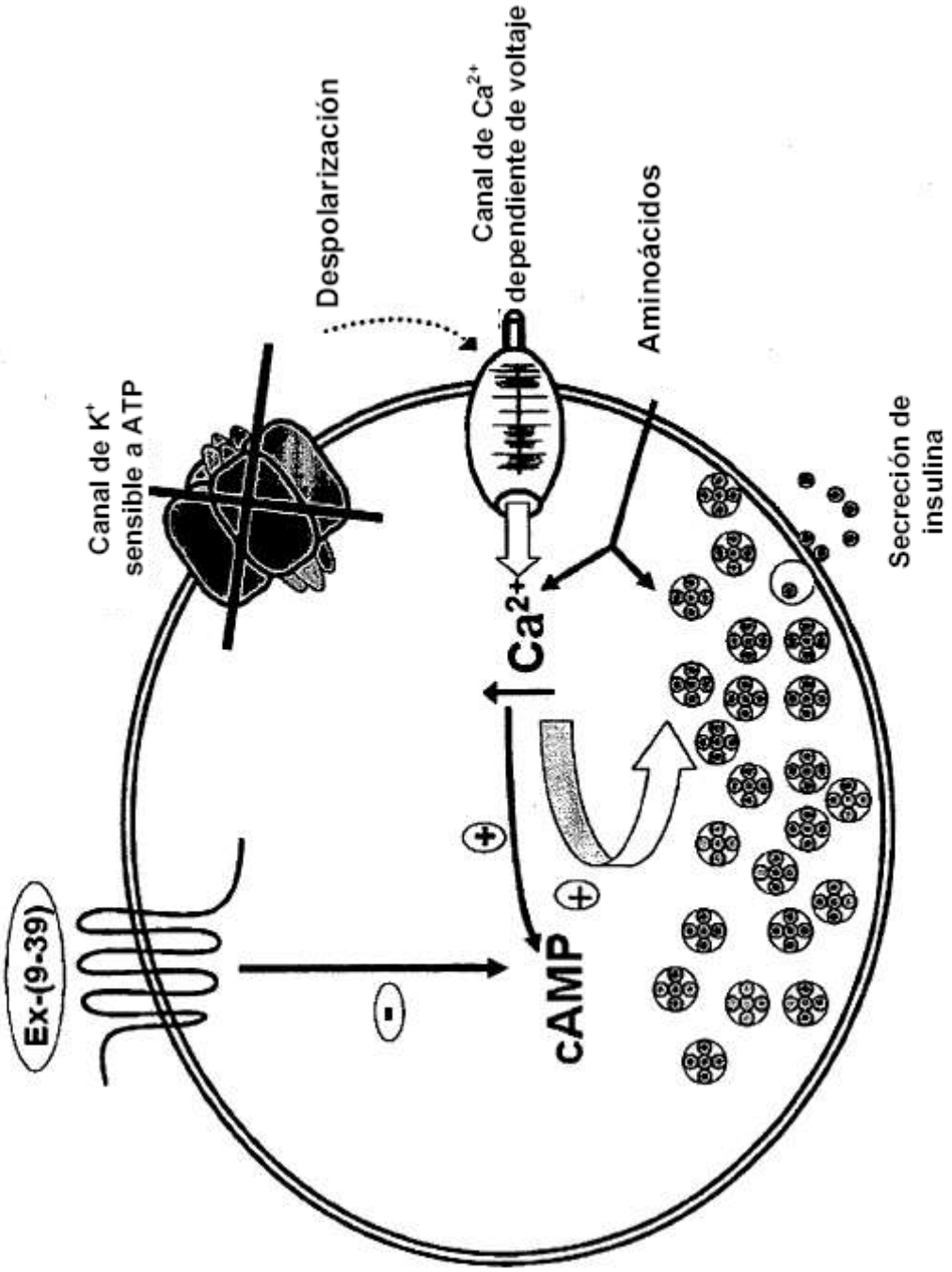
Ex-(9-39)
Canal de K+ sensible a ATP
Despolarización
Canal de Ca2+ dependiente de voltaje
Aminoácidos
Ca2+
cAMP
Secreción de insulina

Figura 7