



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 294 822**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**C07K 14/46** (2006.01)  
**C07K 14/575** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98957897 .6**  
86 Fecha de presentación : **13.11.1998**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1066314**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2001**

54 Título: **Compuestos novedosos de agonistas de exendina.**

30 Prioridad: **14.11.1997 US 65442 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2008**

73 Titular/es: **AMYLIN PHARMACEUTICALS, Inc.**  
**9360 Towne Centre Drive**  
**San Diego, California 92121, US**

72 Inventor/es: **Beeley, Nigel, Robert, Arnold y**  
**Prickett, Kathryn, S.**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

**ES 2 294 822 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

Compuestos novedosos de agonistas de exendina.

5 *Exendina*

Las exendinas son péptidos que se encuentran en el veneno del monstruo de Gila, un lagarto originario de Arizona y el norte de Méjico. La exendina-3 [SEQ. ID. NO. 1] está presente en el veneno de *Heloderma horridum*, y la exendina-4 [SEQ. ID. NO. 2] está presente en el veneno de *Heloderma suspectum* (Eng, J., *et al.*, J. Biol. Chem., 265: 20259-62, 1990; Eng., J., *et al.*, J. Biol. Chem., 267: 7402-05, 1992). La secuencia de aminoácidos de exendina-3 se muestra en la figura 1. La secuencia de aminoácidos de exendina-4 se muestra en la figura 2. Las exendinas tienen cierta similitud de secuencia con varios miembros de la familia de péptidos similares al glucagón, siendo la homología más alta, del 53%, al GLP-1[7-36] NH<sub>2</sub> [SEQ. ID. NO. 3] (Goke, *et al.*, J. Biol. Chem., 268: 19650-55, 1993). El GLP-1[7-36] NH<sub>2</sub>, también conocido como proglucagón[78-107] o simplemente "GLP-1" tal como se usa más frecuentemente en el presente documento, tiene un efecto insulínico, que estimula la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  pancreáticas; el GLP-1 inhibe también la secreción de glucagón de las células  $\alpha$  pancreáticas (Ørsov, *et al.*, Diabetes, 42: 658-61, 1993; D'Alessio, *et al.*, J. Clin. Invest., 97: 133-38, 1996). La secuencia de aminoácidos de GLP-1 se muestra en la figura 3. Se ha informado de que el GLP-1 inhibe el vaciado gástrico (Willms B, *et al.*, J Clin Endocrinol Metab 81 (1): 327-32, 1996; Wettergren A, *et al.*, Dig Dis Sci 38 (4): 665-73, 1993), y la secreción de ácidos gástricos.

Schjoldager BT, *et al.*, Dig Dis Sci 34 (5): 703-8.1989; O'Halloran DJ, *et al.*, J Endocrinol 126 (1): 169-73.1990; Wettergren A, *et al.*, Dig Dis Sci 38 (4): 665-73.1993).

El GLP-1[7-37], que tiene un residuo de glicina adicional en su extremo carboxilo terminal, estimula también la secreción de insulina en los seres humanos (Ørsov, *et al.*, Diabetes, 42: 658-61, 1993).

Se ha clonado un receptor transmembrana con actividad adenilato ciclasa acoplado a proteínas G que se cree que es responsable del efecto insulínico del GLP-1 a partir de una línea de células  $\beta$  (Thorens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8641-45, 1992), denominado en lo sucesivo en el presente documento "receptor de GLP-1 clonado". Según se informa, la exendina-4 actúa en los receptores de GLP-1 sobre las células  $\beta$ TTC1 secretoras de insulina, en las células acinosas dispersas de páncreas de cobayas, y en las células parietales del estómago; se informa también de que el péptido estimula la liberación de somatostatina e inhibe la liberación de gastrina en estómagos aislados (Goke, *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 19650-55, 1993; Schepp, *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 69: 183-91.1994; Eissele, *et al.*, Life Sci., 55: 629-34, 1994). Según se informa, se encontró que la exendina-3 y la exendina-4 estimulan la producción de AMPc en, y la liberación de amilasa de, las células acinosas pancreáticas (Malhotra, R., *et al.*, Regulatory Peptides, 41: 149-56, 1992; Raufman, *et al.*, J. Biol. Chem. 267: 21432-37, 1992; Singh, *et al.*, Regul. Pept. 53: 47-59, 1994). Basándose en sus actividades insulínicas, se ha propuesto el uso de exendina-3 y exendina-4 para el tratamiento de diabetes mellitus y la prevención de hiperglucemia (Eng, patente estadounidense número 5.424.286).

Los agentes que sirven para retrasar el vaciado gástrico han encontrado un sitio en la medicina como ayudas de diagnóstico en exámenes radiológicos gastrointestinales. Por ejemplo, el glucagón es una hormona polipeptídica que se produce por las células  $\alpha$  de los islotes pancreáticos de Langerhans. Es un agente hiperglucémico que moviliza la glucosa activando la glucogenólisis hepática. Puede estimular en un grado menor la secreción de la insulina pancreática. El glucagón se usa en el tratamiento de la hipoglucemia inducida por insulina, por ejemplo, cuando no es posible la administración de glucosa intravenosa. Sin embargo, dado que el glucagón reduce la motilidad del tubo digestivo se usa también como una ayuda de diagnóstico en exámenes radiológicos gastrointestinales. El glucagón se ha usado también en varios estudios para tratar diversos trastornos gastrointestinales dolorosos asociados a espasmos. Daniel, *et al.* (Br. Med. J., 3: 720, 1974) informó del alivio sintomático más rápido de la diverticulitis aguda en pacientes tratados con glucagón en comparación con los que se habían tratado con analgésicos o antiespasmolíticos. Una revisión realizada por Glauser, *et al.* (J. Am. Coll. Emergency Physns, 8: 228, 1979) describió el alivio de la obstrucción esofágica aguda por alimentos siguiendo un tratamiento con glucagón. En otro estudio, el glucagón aliviaba significativamente el dolor y dolor ligero en 21 pacientes con enfermedad de las vías biliares en comparación con 22 pacientes tratados con placebo (M. J. Stower, *et al.*, Br. J. Surg., 69: 591-2, 1982).

En la solicitud internacional número WO 35/07038, publicada el 16 de marzo de 1995 se describen métodos para regular la motilidad gastrointestinal usando agonistas de amilina.

En el documento estadounidense US 6.858.576, presentado el 8 de agosto de 1997, titulado "Methods for Regulating Gastrointestinal Motility" se describen métodos para regular la motilidad gastrointestinal usando agonistas de exendina.

En los documentos WO 98/30231, WO 99/07404, WO 99/25727 y WO 99/25728 se describen métodos para reducir la ingestión de alimentos usando agonistas de exendina.

En la solicitud PCT WO 99/07404, titulada "Novel Exendin Agonist Compunds" se describen compuestos novedosos de agonistas de exendina. En la solicitud PCT WO 99/25728, presentada el 13 de noviembre de 1998, titulada "Novel Exendin Agonist Compunds" se describen otros compuestos novedosos de agonistas de exendina.

**Sumario de la invención**

Según un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto peptídico novedoso de fórmula (I) [SEQ ID NO: 4], en el que dicho compuesto peptídico muestra actividad de agonista de exendina, compuesto que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 11, 13, 14, 15, 18, 23, 24 y 27. La invención proporciona además una composición que comprende estos compuestos en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere también al uso de estos compuestos para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de diabetes mellitus. Cuando se usa para este fin, la composición puede comprender además una cantidad terapéuticamente aceptable de insulina.

En una realización alternativa, la presente invención se refiere al uso de los compuestos anteriores para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un estado hiperglucémico en un mamífero.

**Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 representa el efecto sobre la disminución de la glucemia de diversas concentraciones del compuesto 3 [SEQ. ID. NO. 7].

La figura 2 representa el efecto sobre el vaciado gástrico de diversas concentraciones del compuesto 2 [SEQ. ID. NO. 6].

La figura 3 representa una comparación de los efectos sobre el vaciado gástrico de diversas concentraciones del compuesto 3 [SEQ. ID. NO. 7].

La figura 4 representa una comparación de los efectos sobre el vaciado gástrico de diversas concentraciones del compuesto 10 [SEQ. ID. NO. 14].

La figura 5 representa una comparación de los efectos sobre el vaciado gástrico de diversas concentraciones del compuesto 13 [SEQ. ID. NO. 17].

**Descripción detallada de la invención**

Según un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto peptídico novedoso de fórmula (I) [SEQ ID NO: 4], en el que dicho compuesto peptídico muestra actividad de agonista de exendina, compuesto que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 11, 13, 14, 15, 18, 23, 24 y 27. La invención proporciona además una composición que comprende estos compuestos en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se refiere también al uso de estos compuestos para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes mellitus. Cuando se usa para este fin, la composición puede comprender además una cantidad terapéuticamente eficaz de insulina.

En una realización alternativa, la presente invención se refiere al uso de los compuestos anteriores para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un estado hiperglucémico en un mamífero.

Los compuestos a los que se ha hecho referencia anteriormente forman sales con diversos ácidos y bases orgánicos e inorgánicos. Tales sales incluyen sales preparadas con ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo, HCl, HBr, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico, ácido metanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido maleico, ácido fumárico y ácido canforsulfónico. Las sales preparadas con bases incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos, por ejemplo, sales de sodio y potasio, y sales de metales alcalinotérreos, por ejemplo sales de calcio y magnesio. Se prefieren las sales de acetato, clorhidrato y trifluoroacetato. Las sales pueden formarse por medios convencionales, tales como haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres del producto con uno o más equivalentes del ácido o base apropiado en un disolvente o medio en el que la sal es insoluble, o en un disolvente tal como agua que luego se elimina a vacío o mediante liofilización o mediante intercambio de iones de una sal existente por otro ión en una resina de intercambio iónico adecuada.

**Utilidad**

Los compuestos descritos anteriormente son útiles en vista de sus propiedades farmacológicas. En particular, los compuestos de la invención son agonistas de exendina, y presentan actividad como agentes para regular la motilidad gástrica y para ralentizar el vaciado gástrico, tal como es evidente por la capacidad para reducir los niveles de glucosa posprandial.

Los compuestos de la presente invención son útiles en métodos científicos *in vitro* e *in vivo* para la investigación de exendinas y agonistas de exendina, por ejemplo en métodos tales como los descritos en los ejemplos A-E más adelante.

*Preparación de los compuestos*

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse usando técnicas de síntesis peptídica en fase sólida convencionales y preferiblemente en un sintetizador peptídico automatizado o semiautomatizado.

Normalmente, usando tales técnicas, un aminoácido protegido con  $\alpha$ -N-carbamoilo y un aminoácido unido a la cadena peptídica en crecimiento en una resina, se acoplan a temperatura ambiente en un disolvente inerte tal como dimetilformamida, N-metilpirrolidinona o cloruro de metileno en presencia de agentes de acoplamiento tales como dicitclohexilcarbodiimida y 1-hidroxibenzotriazol en presencia de una base tal como diisopropiletilamina. El grupo protector  $\alpha$ -N-carbamoilo se elimina de la resina-péptido resultante usando un reactivo tal como ácido trifluoroacético o piperidina, y se repite la reacción de acoplamiento con el siguiente amino ácido N-prottegido deseado que va a añadirse a la cadena peptídica. Los grupos protectores de N adecuados se conocen bien en la técnica, prefiriéndose en el presente documento t-butiloxicarbonilo (tBoc) y fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).

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

La síntesis peptídica en fase sólida puede llevarse a cabo con un sintetizador peptídico automático (Modelo 430A, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) usando el sistema NMP/HOBt (opción 1) y la química de tBoc o Fmoc (véase el manual de usuario de Applied Biosystems para el sintetizador peptídico ABI 430A, Versión 1.3B, 1 de julio de 1988, sección 6, páginas 49-70, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) con ocupación de extremos. Las resinas peptídicas protegidas con Boc pueden escindirse con HF (de -5°C a 0°C, 1 hora). El péptido puede extraerse de la resina alternando agua y ácido acético, y los filtrados liofilizados. Las resinas peptídicas protegidas con Fmoc pueden escindirse según métodos convencionales (Introduction to Cleavage Techniques, Applied Biosystems, Inc., 1990, páginas 6- 12). Los péptidos pueden unirse también usando un sintetizador de Advanced Chem Tech (modelo MPS 350, Louisville, Kentucky).

Los péptidos pueden purificarse mediante RP-HPLC (preparativa y analítica) usando un sistema Waters Delta Prep 3000. Puede usarse una columna preparativa C4, C8 o C18 (10  $\mu$ , 2,2 x 25 cm; Vydac, Hesperia, CA) para aislar los péptidos, y puede determinarse la pureza usando una columna analítica C4, C8 o C18 (5  $\mu$ , 0,46 x 25 cm; Vydac). Los disolventes (A = 0,1% de TFA/agua y B = 0,1% de TFA/CH<sub>3</sub>CN) pueden suministrarse a la columna analítica a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min y a la columna preparativa a 15 ml/min. Los análisis de aminoácidos pueden realizarse en el sistema Waters Pico Tag y procesarse usando el programa Maxima. Los péptidos pueden hidrolizarse mediante hidrólisis ácida en fase vapor (115°C, 20-24 h). Los hidrolizados pueden derivatizarse y analizarse mediante métodos convencionales (Cohen, *et al.*, The Pico Tag Method: A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis, páginas 11-52, Millipore Corporation, Milford, MA (1989)). El análisis de bombardeo con átomos rápidos puede llevarse a cabo mediante M-Scan, Incorporated (West Chester, PA). La calibración de la masa puede realizarse usando yoduro de cesio o yoduro de cesio/glicerol. Los análisis de ionización por desorción de plasma usando un tiempo de detección de vuelo pueden llevarse a cabo en un espectrómetro de masas Bio-Ion 20 de Applied Biosystems. La espectroscopia de masas por electrospray puede llevarse a cabo en una máquina VG-Trio.

Los compuestos peptídicos útiles en la invención pueden prepararse también usando técnicas de ADN recombinante, usando métodos conocidos en la técnica en la actualidad. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor (1989). Los compuestos no peptídicos útiles en la presente invención pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica.

*Formulación y administración*

Los compuestos de la invención son útiles en vista de sus efectos similares a los de la exendina, y pueden proporcionarse convenientemente en forma de formulaciones adecuadas para su administración parenteral (incluyendo intravenosa, intramuscular y subcutánea) o nasal, sublingual, bucal u oral. En algunos casos será conveniente proporcionar un agonista de exendina y otro agente anti-vaciado gástrico, tal como glucagón, una amilina, o un agonista de amilina, en una única composición o disolución para administrarlos juntos. En otros casos, puede ser más ventajoso administrar otro agente anti-vaciado separado de dicho agonista de exendina. Todavía en otros casos, puede ser beneficioso proporcionar un agonista de exendina o bien formulado conjuntamente o bien por separado con otros agentes hipoglucemiantes, tales como insulina. Un médico puede determinar un formato de administración adecuado de la mejor forma posible para cada paciente individualmente. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados y su formulación se describen en tratados convencionales de formulación, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences de E. W. Martin. Véase también Wang, Y. J. y Hanson, M. A. "Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers", Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report N° 10, Sup. 42: 2S (1988).

## ES 2 294 822 T3

Los compuestos útiles en la invención pueden proporcionarse como composiciones parenterales para inyección o infusión. Pueden, por ejemplo, suspenderse en un aceite inerte, de manera adecuada un aceite vegetal tal como aceite de sésamo, cacahuete, oliva, u otro vehículo aceptable. Preferiblemente, se suspenden en un vehículo acuoso, por ejemplo, en una disolución tampón isotónica a un pH de aproximadamente 5,6 a 7,4. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden someterse a filtración para hacerlas estériles. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiera para las condiciones fisiológicas aproximadas, tales como agentes de tamponantes de pH. Los tampones útiles incluyen por ejemplo, tampones de acetato de sodio/ácido acético. Puede usarse una forma de preparación de liberación lenta de almacenamiento o "depósito" de modo que se suministren cantidades terapéuticamente eficaces de la preparación a la circulación sanguínea durante muchas horas o días tras la inyección transdérmica u otra forma de administración.

La isotonicidad deseada puede lograrse usando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente aceptables tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato de sodio, propilenglicol, polioles (tales como manitol y sorbitol), u otros solutos orgánicos o inorgánicos. Particularmente se prefiere el cloruro de sodio para los tampones que contienen iones sodio.

Los compuestos reivindicados pueden formularse también como sales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, sales de adición de ácido) y/o complejos de las mismas. Las sales farmacéuticamente aceptables son sales no tóxicas a la concentración en la que se administran. La preparación de tales sales puede facilitar el uso farmacológico mediante la modificación de las características fisicoquímicas de la composición sin impedir que la composición ejerza su efecto fisiológico. Ejemplos de modificaciones útiles de las propiedades físicas incluyen disminuir el punto de fusión para facilitar la administración transmucosa y aumentar la solubilidad para facilitar la administración de concentraciones más altas del fármaco.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido tales como aquellas que contienen sulfato, clorhidrato, fosfato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato, ciclohexilsulfamato y quinato. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse a partir de ácidos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido sulfámico, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido ciclohexilsulfámico y ácido quínico. Tales sales pueden prepararse, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres del producto con uno o más equivalentes de la base o ácido apropiados en un disolvente o medio en el que la sal es insoluble, o en un disolvente tal como agua que se elimina luego a vacío o mediante liofilización o mediante intercambio de iones de una sal existente por otro ión en una resina de intercambio iónico adecuada.

También pueden usarse vehículos o excipientes para facilitar la administración del compuesto. Los ejemplos de vehículos y excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares tales como lactosa, glucosa o sacarosa, o tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, polietilenglicoles y disolventes fisiológicamente compatibles. Las composiciones o composición farmacéutica pueden administrarse por diferentes vías incluyendo por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea e intramuscular, oral, tópica, transdérmica, bucal o transmucosa.

Si se desea, las disoluciones de las composiciones anteriores pueden espesarse con un agente espesante tal como metilcelulosa. Pueden prepararse en forma emulsionada, o bien agua en aceite o bien aceite en agua. Puede emplearse cualquiera de una amplia variedad de agentes emulsionantes farmacéuticamente aceptables, incluyendo, por ejemplo, polvo de goma arábiga, un tensioactivo no iónico (tal como Tween), o un tensioactivo iónico (tal como poliéter alcohol-sulfatos o sulfonatos alcalinos, por ejemplo Triton).

Las composiciones útiles de la invención se preparan mezclando los componentes siguiendo procedimientos generalmente aceptados. Por ejemplo, pueden mezclarse simplemente los componentes seleccionados en una mezcladora u otro dispositivo convencional para producir una mezcla concentrada que pueda entonces ajustarse a la concentración y viscosidad finales mediante la adición de agua o agente espesante y posiblemente un tampón para controlar el pH o un soluto adicional para controlar la tonicidad.

Para su uso por los médicos, los compuestos se proporcionarán en una forma farmacéutica unitaria que contiene una cantidad de agonista de exendina, con o sin otro agente anti-vaciado. Las cantidades terapéuticamente eficaces de un agonista de exendina para su uso en el control del vaciado gástrico y en estados en los que se ralentiza o regula de manera beneficiosa el vaciado gástrico, son aquellas que disminuyen la glucemia posprandial, preferiblemente hasta no más de aproximadamente 8 ó 9 mM, o de modo que se reduzca la glucemia según se desee. En individuos diabéticos o con intolerancia a la glucosa, la glucemia plasmática es mayor que en los individuos normales. En tales individuos, puede obtenerse una reducción beneficiosa o "suavizado" de la glucemia posprandial. Tal como reconocerán los expertos en este campo, una cantidad eficaz de agente terapéutico variará con muchos factores incluyendo el estado físico del paciente, la glucemia o el nivel de inhibición del vaciado gástrico que ha de obtenerse, y otros factores.

Tales composiciones farmacéuticas son útiles para producir hipomotilidad gástrica en un sujeto y pueden usarse también en otros trastornos en los que la motilidad gástrica se reduce de manera beneficiosa.

La dosis diaria anti-vaciado eficaz de los compuestos estará normalmente en el intervalo de 0,001 ó 0,005 a aproximadamente 5 mg/día preferiblemente de aproximadamente 0,01 ó 0,05 a 2 mg/día y más preferiblemente de apro-

## ES 2 294 822 T3

ximadamente 0,05 ó 0,1 a 1 mg/día, para un paciente de 70 kg. La dosis exacta que ha de administrarse se determina por el médico encargado y depende de si el compuesto particular entra dentro del intervalo citado anteriormente, así como de la edad, peso y estado del individuo. La administración debe comenzar con el primer signo de síntomas o poco después del diagnóstico de la diabetes mellitus. La administración puede ser por inyección, preferiblemente subcutánea o intramuscular, o por otras vías, por ejemplo, mediante administración oral, nasal, sublingual o bucal. Para la administración oral, nasal o bucal, las dosificaciones deben aumentarse hasta aproximadamente 5-10 veces con respecto a las dosificaciones en inyección.

Generalmente, para tratar o prevenir la glucemia posprandial elevada, inapropiada o indeseada, pueden administrarse los compuestos de esta invención a los pacientes que necesiten tal tratamiento en intervalos de dosificación similares a los facilitados anteriormente, sin embargo, los compuestos se administran más frecuentemente, por ejemplo, una, dos o tres veces al día.

La formulación y el modo de administración óptimos de los compuestos de la presente solicitud a un paciente dependen de factores conocidos en la técnica, tales como la enfermedad o el trastorno particulares, el efecto deseado y el tipo de paciente. Aunque los compuestos se usarán normalmente para tratar pacientes humanos, pueden usarse también para tratar enfermedades similares o idénticas en otros vertebrados, tales como otros primates, animales de granja, tales como cerdo, ganado y aves, y animales para deportes y mascotas tales como caballos, perros y gatos.

Para ayudar a comprender la presente invención se incluyen los siguientes ejemplos, que describen los resultados de una serie de experimentos.

### Ejemplo 1

#### Preparación del compuesto 7

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ala Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH<sub>2</sub> [SEQ. ID. NO. 11]

Se unió el péptido amidado identificado anteriormente en una resina de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc-aminometil-fenoxi-acetamida-norleucina-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) usando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se escindió de la resina, se desprotegió y purificó de manera similar al compuesto 1. En el análisis, se usaron el disolvente A (TFA al 0,1% en agua) y el disolvente B (TFA al 0,1% en ACN). La RP-HPLC analítica (gradiente del 36% al 46% de disolvente B en disolvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado dio el péptido producto que tenía un tiempo de retención observado de 15,2 minutos. Espectrometría de masas por electrospray (M): calculado 3221,6; hallado 3222,7.

### Ejemplo 2

#### Preparación del compuesto 9

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ala Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH<sub>2</sub> [SEQ. ID. NO. 13]

Se unió el péptido amidado identificado anteriormente en una resina de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc-aminometil-fenoxi-acetamida-norleucina-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) usando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se escindió de la resina, se desprotegió y se purificó de manera similar al compuesto 1. En el análisis, se usaron el disolvente A (TFA al 0,1% en agua) y el disolvente B (TFA al 0,1% en ACN). La RP-HPLC analítica (gradiente del 38% al 48% de disolvente B en disolvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado dio el péptido producto que tenía un tiempo de retención observado de 15,7 minutos. Espectrometría de masas por electrospray (M): calculado 3221,6; hallado 3221,6.

### Ejemplo 3

#### Preparación del compuesto 10

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Ala Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn-NH<sub>2</sub> [SEQ. ID. NO. 14]

Se unió el péptido amidado identificado anteriormente en una resina de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc-aminometil-fenoxi-acetamida-norleucina-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) usando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se escindió de la resina, se desprotegió y se purificó de manera similar al compuesto 1. En el análisis, se usaron el disolvente A (TFA al 0,1% en agua) y el disolvente B (TFA al 0,1% en ACN). La RP-HPLC analítica (gradiente del 38% al 48% de disolvente B en disolvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado dio el péptido producto que tenía un tiempo de retención observado de 18,1 minutos. Espectrometría de masas por electrospray (M): calculado 3180,5; hallado 3180,9.

## ES 2 294 822 T3

### Ejemplo 4

#### *Preparación del compuesto 11*

5 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Ala Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys  
Asn-NH<sub>2</sub> [SEQ. D. NO. 15]

Se unió el péptido amidado identificado anteriormente en una resina de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc-aminometil-fenoxi-acetamida-norleucina-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) usando aminoácidos protegidos con Fmoc  
10 (Applied Biosystems, Inc.), se escindió de la resina, se desprotegió y se purificó de manera similar al compuesto 1. En el análisis, se usaron el disolvente A (TFA al 0,1% en agua) y el disolvente B (TFA al 0,1% en ACN). La RP-HPLC analítica (gradiente del 36% al 46% de disolvente B en disolvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado dio el péptido producto que tenía un tiempo de retención observado de 17,0 minutos. Espectrometría de masas por electrospray (M): calculado 3180,6; hallado 3182,8.

15

### Ejemplo 5

#### *Preparación del compuesto 14*

20

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Ala Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys  
Asn-NH<sub>2</sub> [SEQ. ID. NO. 18]

Se unió el péptido amidado identificado anteriormente en una resina de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc-aminometil-fenoxi-acetamida-norleucina-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) usando aminoácidos protegidos con Fmoc  
25 (Applied Biosystems, Inc.), se escindió de la resina, se desprotegió y se purificó de manera similar al compuesto 1. En el análisis, se usaron el disolvente A (TFA al 0,1% en agua) y el disolvente B (TFA al 0,1% en ACN). La RP-HPLC analítica (gradiente del 37% al 47% de disolvente B en disolvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado dio el péptido producto que tenía un tiempo de retención observado de 14,3 minutos. Espectrometría de masas por electrospray (M): calculado 3179,6; hallado 3180,0.

30

### Ejemplo 6

35 *Preparación del compuesto 15*

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Ala Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys  
Asn-NH<sub>2</sub> [SEQ. ID. NO. 19]

40 Se unió el péptido identificado anteriormente en una resina de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc-aminometil-fenoxi-acetamida-norleucina-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) usando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se escindió de la resina, se desprotegió y se purificó de manera similar al compuesto 1. En el análisis, se usaron el disolvente A (TFA al 0,1% en agua) y el disolvente B (TFA al 0,1% en ACN). La RP-HPLC analítica (gradiente del 37% al 47% de disolvente B en disolvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado dio el péptido  
45 producto que tenía un tiempo de retención observado de 13,7 minutos. Espectrometría de masas por electrospray (M): calculado 3179,6; hallado 3179,0.

### Ejemplo 7

50

#### *Preparación del compuesto 19*

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Ala Phe Leu Lys  
Asn-NH<sub>2</sub> [SEQ. ID. NO. 23]

55

Se unió el péptido amidado identificado anteriormente en una resina de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc-aminometil-fenoxi-acetamida-norleucina-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) usando aminoácidos protegidos con Fmoc  
60 (Applied Biosystems, Inc.), se escindió de la resina, se desprotegió y se purificó de manera similar al compuesto 1. En el análisis se usaron el disolvente A (TFA al 0,1% en agua) y el disolvente B (TFA al 0,1% en ACN). La RP-HPLC analítica (gradiente del 38% al 48% de disolvente B en disolvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado dio el péptido producto que tenía un tiempo de retención observado de 10,9 minutos. Espectrometría de masas por electrospray (M): calculado 3179,6; hallado 3180,5.

65

## ES 2 294 822 T3

### Ejemplo 8

#### *Preparación del compuesto 20*

5 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Ala Leu Lys  
Asn-NH<sub>2</sub> [SEQ. ID. NO. 24]

Se unió el péptido amidado identificado anteriormente en una resina de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc-aminometil-fenoxi-acetamida-norleucina-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) usando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se escindió de la resina, se desprotegió y se purificó de manera similar al compuesto 1. En el análisis, se usaron el disolvente A (TFA al 0,1% en agua) y el disolvente B (TFA al 0,1% en ACN). La RP-HPLC analítica (gradiente del 32% al 42% de disolvente B en disolvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado dio el péptido producto que tenía un tiempo de retención observado de 17,5 minutos. Espectrometría de masas por electrospray (M): calculado 3161,5; hallado 3163,0.

15  
Ejemplo 9

#### *Preparación del compuesto 23*

20 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys  
Ala-NH<sub>2</sub> [SEQ. ID. NO. 27]

Se unió el péptido amidado identificado anteriormente en una resina de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc-aminometil-fenoxi-acetamida-norleucina-MBHA (Novabiochem, 0,55 mmoles/g) usando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se escindió de la resina, se desprotegió y se purificó de manera similar al compuesto 1. En el análisis, se usaron el disolvente A (TFA al 0,1% en agua) y el disolvente B (TFA al 0,1% en ACN). La RP-HPLC analítica (gradiente del 34% al 44% de disolvente B en disolvente A durante 30 minutos) del péptido liofilizado dio el péptido producto que tenía un tiempo de retención observado de 22,8 minutos. Espectrometría de masas por electrospray (M): calculado 3194,6; hallado 3197,6.

30  
Ejemplos A a E

#### *Reactivos usados*

35 Se adquirió el GLP-1(7-36)[NH<sub>2</sub>] de Bachem (Torrance, CA). Se prepararon todos los otros péptidos usando métodos de síntesis tales como los descritos en el presente documento. Todos los productos químicos eran de la mayor calidad comercial. El inmunoensayo SPA de AMPc se adquirió de Amersham. Los radioligandos se adquirieron de New England Nuclear (Boston, MA). Se cultivaron células RINmSf (Colección Americana de Tejidos Tipo, Rockville, MD) en medio DME/F12 que contenía suero bovino fetal al 10% y L-glutamina 2 mM. Se cultivaron las células a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%/aire humidificado al 95% y se sustituyó el medio cada 2 ó 3 días. Se cultivaron las células hasta confluencia, luego se recogieron y se homogeneizaron usando un homogeneizador Polytron. Se almacenaron los homogeneizados celulares congelados a -70°C hasta su uso.

45  
Ejemplo A

#### *Estudios de unión al receptor de GLP-1*

Se evaluó la unión al receptor midiendo el desplazamiento de [<sup>125</sup>I]GLP-1 o [<sup>125</sup>I]exendina(9-39) de las membranas de RINm5f.

50 El tampón de ensayo contenía bestatina 5 µg/ml, fosforamidona 1 µg/ml, albúmina de suero bovino 1 mg/ml (fracción V), bacitracina 1 mg/ml, y MgCl<sub>2</sub> 1 mM en HEPES 20 mM, pH 7,4. Para medir la unión, se resuspendieron 30 µg de proteína de membrana (ensayo de proteínas de Bradford) en 200 µl de tampón de ensayo y se incubaron con [<sup>125</sup>I]GLP-1 o [<sup>125</sup>I]exendina(9-39) 60 pM y péptidos no marcados durante 120 minutos a 23°C en placas de 96 pocillos (Nagle Nunc, Rochester, NY). Se terminaron las incubaciones mediante filtración rápida con solución salina tamponada con fosfato fría, pH 7,4, a través de filtros de fibra de vidrio GF/B tratados con polietiliminina (Wallac Inc., Gaithersburg, MD) usando un colector de placas Tomtec Mach II (Wallac Inc., Gaithersburg, MD). Se secaron los filtros, se combinaron con un agente de centelleo, y se determinó la radioactividad en un contador de centelleo líquido Betaplate (Wallac Inc.).

60 Se trataron las muestras peptídicas en el ensayo como puntos por duplicado a 6 diluciones a lo largo de un intervalo de concentración de 10<sup>-6</sup> M a 10<sup>-12</sup> M para generar curvas de respuesta. La actividad biológica de una muestra se expresa como un valor de CI<sub>50</sub>, calculado a partir de los datos sin procesar usando un programa de ajuste de curva iterativo que usa una ecuación logística de 4 parámetros (Prizm<sup>TM</sup>, programa GraphPAD). Los resultados se muestran en la tabla I.

# ES 2 294 822 T3

TABLA I

	<u>Compuesto</u>	<u>CI<sub>50</sub> (nM)</u>
5	Exendina-4 [SEQ. ID. NO. 2]	0,70
	Compuesto 1 [SEQ. ID. NO. 5]	0,67
	Compuesto 2 [SEQ. ID. NO. 6]	1,21
10	Compuesto 3 [SEQ. ID. NO. 7]	0,67
	Compuesto 4 [SEQ. ID. NO. 8]	0,42
15	Compuesto 5 [SEQ. ID. NO. 9]	1,91
	Compuesto 6 [SEQ. ID. NO. 10]	59,05
	Compuesto 7 [SEQ. ID. NO. 11]	5,44
20	Compuesto 8 [SEQ. ID. NO. 12]	1,75
	Compuesto 9 [SEQ. ID. NO. 13]	0,88
	Compuesto 10 [SEQ. ID. NO. 14]	1,96
25	Compuesto 11 [SEQ. ID. NO. 15]	0,69
	Compuesto 12 [SEQ. ID. NO. 16]	2,94
	Compuesto 13 [SEQ. ID. NO. 17]	7,82
30	Compuesto 14 [SEQ. ID. NO. 18]	0,04
	Compuesto 15 [SEQ. ID. NO. 19]	0,48
35	Compuesto 16 [SEQ. ID. NO. 20]	1,10
	Compuesto 17 [SEQ. ID. NO. 21]	21,6
	Compuesto 18 [SEQ. ID. NO. 22]	0,63
40	Compuesto 19 [SEQ. ID. NO. 23]	0,63
	Compuesto 20 [SEQ. ID. NO. 24]	0,94
	Compuesto 21 [SEQ. ID. NO. 25]	9,91
45	Compuesto 22 [SEQ. ID. NO. 26]	8,24
	Compuesto 23 [SEQ. ID. NO. 27]	0,82

## 50 Ejemplo B

### *Estudio de activación de ciclasa*

55 El tampón de ensayo contenía GTP 10  $\mu$ M, ATP 0,75 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, fosfocreatina 0,5 mM, creatina quinasa 12,5 U/ml, aprotinina 0,4 mg/ml, IBMX 1  $\mu$ M en HEPES 50 mM, pH 7,4. Se combinaron las membranas y los péptidos en 100 ml de tampón de ensayo en placas con fondo de filtro de 96 pocillos (Millipore Corp., Bedford, MA). Tras 20 minutos de incubación a 37°C, se terminó el ensayo mediante la transferencia del sobrenadante mediante filtración a una placa de 96 pocillos nueva usando un colector a vacío de Millipore. Se cuantificó el contenido en AMPc del sobrenadante mediante inmunoensayo SPA.

60

Se trataron las muestras peptídicas en el ensayo como puntos por triplicado a 7 diluciones a lo largo de un intervalo de concentración de 10<sup>-6</sup> M a 10<sup>-12</sup> M para generar las curvas de respuesta. Se expresó la actividad biológica de una muestra particular como valor de CE<sub>50</sub>, calculado tal como se describió anteriormente. Los resultados se presentan en forma de tabla en la tabla II.

65

## ES 2 294 822 T3

TABLA II

	<b>Compuesto</b>	<u>CE<sub>50</sub> (nM)</u>
5	Exendina-4 [SEQ. ID. NO. 2]	0,23
	Compuesto 1 [SEQ. ID. NO. 5]	0,3
	Compuesto 2 [SEQ. ID. NO. 6]	0,79
10	Compuesto 3 [SEQ. ID. NO. 7]	2,35
	Compuesto 4 [SEQ. ID. NO. 8]	0,22
	Compuesto 5 [SEQ. ID. NO. 9]	9,85
15	Compuesto 6 [SEQ. ID. NO. 10]	79,4
	Compuesto 7 [SEQ. ID. NO. 11]	63,6
	Compuesto 8 [SEQ. ID. NO. 12]	6,8
20	Compuesto 9 [SEQ. ID. NO. 13]	1,68
	Compuesto 10 [SEQ. ID. NO. 14]	5,37
	Compuesto 11 [SEQ. ID. NO. 15]	0,48
25	Compuesto 12 [SEQ. ID. NO. 16]	15,55
	Compuesto 13 [SEQ. ID. NO. 17]	79,6
30	Compuesto 14 [SEQ. ID. NO. 18]	1,11
	Compuesto 15 [SEQ. ID. NO. 19]	1,05
	Compuesto 16 [SEQ. ID. NO. 20]	5,12
35	Compuesto 17 [SEQ. ID. NO. 21]	43,6
	Compuesto 18 [SEQ. ID. NO. 22]	0,76
	Compuesto 19 [SEQ. ID. NO. 23]	3,68
40	Compuesto 20 [SEQ. ID. NO. 24]	5,25
	Compuesto 21 [SEQ. ID. NO. 25]	45,1
45	Compuesto 22 [SEQ. ID. NO. 26]	20,43
	Compuesto 23 [SEQ. ID. NO. 27]	3,05

### 50 Ejemplo C

#### *Determinación de la glucemia en ratones db/db*

55 Se utilizaron ratones C57BLKS/J-m-db de al menos 3 meses de edad para el estudio. Se obtuvieron los ratones de The Jackson Laboratory y se dejó que se aclimataran durante al menos una semana antes de usarlos. Se alojaron los ratones en grupos de diez a  $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  con un ciclo de luz:oscuridad 12:12, encendiendo las luces a las 6 a.m. Se privó de alimento a todos los animales durante 2 horas antes de extraer las muestras de sangre iniciales. Se extrajeron aproximadamente  $70 \mu\text{l}$  de sangre de cada ratón mediante punción ocular, tras una leve anestesia con metofano. Tras recoger las muestras de sangre iniciales, para medir las concentraciones de glucosa plasmática, todos los animales 60 recibieron inyecciones subcutáneas o bien del vehículo (NaCl al 10,9%), exendina-4 o bien del vehículo del compuesto de prueba ( $1 \mu\text{g}$ ). Se extrajeron de nuevo muestras de sangre, usando el mismo procedimiento, tras exactamente una hora desde las inyecciones, y se midieron las concentraciones de glucosa plasmática.

65 Se calculó para cada animal el cambio en % del valor plasmático, a partir del valor inicial. La disminución en porcentaje de la glucosa plasmática tras una hora se muestra en la tabla III.

# ES 2 294 822 T3

## TABLA III

5	Compuesto de prueba	<u>disminución en % de</u>	
		<u>glucosa</u>	
	Exendina-4 [SEQ. ID. NO. 2]	39%	(n = 78)
10	Compuesto 2 [SEQ. ID. NO. 6]	38%	(n = 4)
	Compuesto 3 [SEQ. ID. NO. 7]	49%	(n = 4)
	Compuesto 4 [SEQ. ID. NO. 8]	27%	(n = 4)
15	Compuesto 5 [SEQ. ID. NO. 9]	47%	(n = 4)
	Compuesto 6 [SEQ. ID. NO. 10]	40%	(n = 5)
	Compuesto 7 [SEQ. ID. NO. 11]	31%	(n = 4)
20	Compuesto 8 [SEQ. ID. NO. 12]	44%	(n = 4)
	Compuesto 9 [SEQ. ID. NO. 13]	41%	(n = 4)
	Compuesto 10 [SEQ. ID. NO. 14]	46%	(n = 4)
25	Compuesto 11 [SEQ. ID. NO. 15]	40%	(n = 4)
	Compuesto 12 [SEQ. ID. NO. 16]	53%	(n = 4)
30	Compuesto 13 [SEQ. ID. NO. 17]	45%	(n = 4)
	Compuesto 14 [SEQ. ID. NO. 18]	54%	(n = 4)
	Compuesto 15 [SEQ. ID. NO. 19]	45%	(n = 4)
35	Compuesto 16 [SEQ. ID. NO. 20]	54%	(n = 4)
	Compuesto 17 [SEQ. ID. NO. 21]	45%	(n = 4)
	Compuesto 18 [SEQ. ID. NO. 22]	50%	(n = 4)
40	Compuesto 19 [SEQ. ID. NO. 23]	48%	(n = 4)
	Compuesto 20 [SEQ. ID. NO. 24]	37%	(n = 4)
	Compuesto 21 [SEQ. ID. NO. 25]	30%	(n = 4)
45	Compuesto 22 [SEQ. ID. NO. 26]	46%	(n = 4)
	Compuesto 23 [SEQ. ID. NO. 27]	42%	(n = 4)

### 50 Ejemplo D

#### *Determinación de la respuesta a la dosis de la glucemia en ratones db/db*

55 Se utilizaron ratones C57BLKS/J-m-db/db de al menos 3 meses de edad para el estudio. Se obtuvieron los ratones de The Jackson Laboratory y se dejó que se aclimataran durante al menos una semana antes de usarlos. Se alojaron los ratones en grupos de diez a  $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  con un ciclo de luz:oscuridad 12:12, encendiendo las luces a las 6 a.m. Se privó de alimento a todos los animales durante 2 horas antes de extraer las muestras de sangre iniciales. Se extrajeron aproximadamente  $70 \mu\text{l}$  de sangre de cada ratón mediante punción ocular, tras una leve anestesia con metofano. Tras  
60 recoger las muestras de sangre iniciales, para medir las concentraciones de glucosa plasmática, todos los animales recibieron inyecciones subcutáneas o bien del vehículo, exendina-4 o bien del compuesto de prueba en las concentraciones indicadas. Se extrajeron de nuevo muestras de sangre, usando el mismo procedimiento, tras exactamente una hora desde las inyecciones, y se midieron las concentraciones de glucosa plasmática.

65 Se calculó para cada animal el cambio en % del valor plasmático, a partir del valor inicial y se evaluó una relación dependiente de la dosis usando el programa Graphpad Prizm™.

## ES 2 294 822 T3

La figura 5 representa los efectos de variar las dosis de exendina-4 [SEQ. ID. NO. 2] y compuesto 3 [SEQ. ID. NO. 7] sobre los niveles de glucosa plasmática. La exendina-4 tenía una  $DE_{50}$  de  $0,01 \mu\text{g}$  por ratón y el compuesto 3 tenía una  $DE_{50}$  de  $0,04 \mu\text{g}$  por ratón.

### 5 Ejemplo E

#### *Vaciado gástrico*

10 Se llevó a cabo el siguiente estudio para examinar los efectos de la exendina-4 y los compuestos de agonistas de exendina de la presente invención sobre el vaciado gástrico en ratas. Este experimento siguió una modificación del método de Scarpignato, *et al.*, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 246:286-94, 1980.

15 Se usaron ratas Harlan Sprague Dawley (HSD) macho. Se alojaron todos los animales a  $22,7 \pm 0,8^\circ\text{C}$  en un ciclo de luz:oscuridad 12:12 (realizándose los experimentos durante el ciclo de luz) y se les dio agua y alimento a voluntad (dieta LM-485, Teklad, Madison, WI). Se sintetizó exendina-4 según métodos de síntesis peptídica convencionales. La preparación de los compuestos 2, 3, 10 y 13 [SEQ. ID. NOS. 6, 7, 14 y 17] se describe en los ejemplos 2, 3, 10 y 13, respectivamente.

20 Se realizó la determinación del vaciado gástrico mediante el método descrito a continuación tras ~20 horas de ayuno para garantizar que el estómago no contenía ningún quimo que interfiriese con las mediciones de absorbancia espectrofotométrica.

25 Las ratas conscientes recibieron mediante sonda nasogástrica 1,5 ml de un gel acalórico que contenía metilcelulosa al 1,5% (M-0262, Sigma Chemical Co, St Louis, MO) e indicador rojo de fenol al 0,05%. Veintes minutos tras la administración por sonda nasogástrica, se anestesiaron las ratas usando halotano al 5%, se expuso el estómago y se sujetaron con pinzas los esfínteres pilórico y esofágico inferior usando pinzas hemostáticas, se extrajeron y se abrieron en una disolución alcalina que se preparó hasta un volumen fijado. Se derivó el contenido del estómago a partir de la intensidad del rojo de fenol en la disolución alcalina, medida mediante la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. En experimentos separados en 7 ratas, se extirparon el estómago e intestino delgado y se abrieron en una disolución alcalina. La cantidad de rojo de fenol que pudo recuperarse del tubo digestivo superior en el plazo de 20 minutos desde la administración por sonda nasogástrica fue del  $89 \pm 4\%$ ; el colorante que parecía unirse irremediablemente a la superficie de la luz del intestino puede haber explicado el equilibrio. Para explicar una recuperación del colorante máxima inferior al 100%, se expresó el porcentaje del contenido del estómago tras 20 min. como una fracción del contenido gástrico recuperado de las ratas control sacrificadas inmediatamente después de la administración por sonda nasogástrica en el mismo experimento. Contenido gástrico en porcentaje restante = (absorbancia a lo 20 min.)/(absorbancia a 0 mm) x 100.

40 En estudios iniciales, sin tratamiento con fármaco, se determinó el vaciado gástrico durante 20 min. En estudios de respuesta a la dosis, se trataron las ratas con 0,01, 0,1, 0,3, 1, 10 y 100  $\mu\text{g}$  de exendina-4, y 0,1, 0,3, 1, 10 y 100  $\mu\text{g}$  de los compuestos 2, 3, 10 y 13 [SEQ. ID. NO: 6, 7, 14 Y 17].

45 Los resultados, mostrados en las figuras 6-9, muestran que los agonistas de exendina, los compuestos 2, 3, 10 y 13 son inhibidores potentes del vaciado gástrico. La  $CE_{50}$  para la exendina-4 fue de  $0,27 \mu\text{g}$ . La  $CE_{50}$  para el compuesto 2 fue de  $0,79 \mu\text{g}$ , para el compuesto 3 de  $0,34 \mu\text{g}$ , para el compuesto 10 fue de  $0,27 \mu\text{g}$ , y para el compuesto 13 fue de  $60 \mu\text{g}$ .

50

55

60

65

# ES 2 294 822 T3

## REIVINDICACIONES

5 1. Compuesto peptídico de fórmula (I) [SEQ. ID. NO: 4], en el que dicho compuesto peptídico muestra actividad de agonista de exendina, compuesto que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ. ID. NO: 11, 13, 14, 15, 18, 19, 23, 24 y 27.

2. Composición que comprende un compuesto según la reivindicación 1 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 3. Uso de un compuesto según la reivindicación 1, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la diabetes mellitus.

15 4. Uso según la reivindicación 3, comprendiendo dicha composición además una cantidad terapéuticamente eficaz de una insulina.

5. Uso de un compuesto según la reivindicación 1, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un estado hiperglucémico en un mamífero.

20

25

30

35

40

45

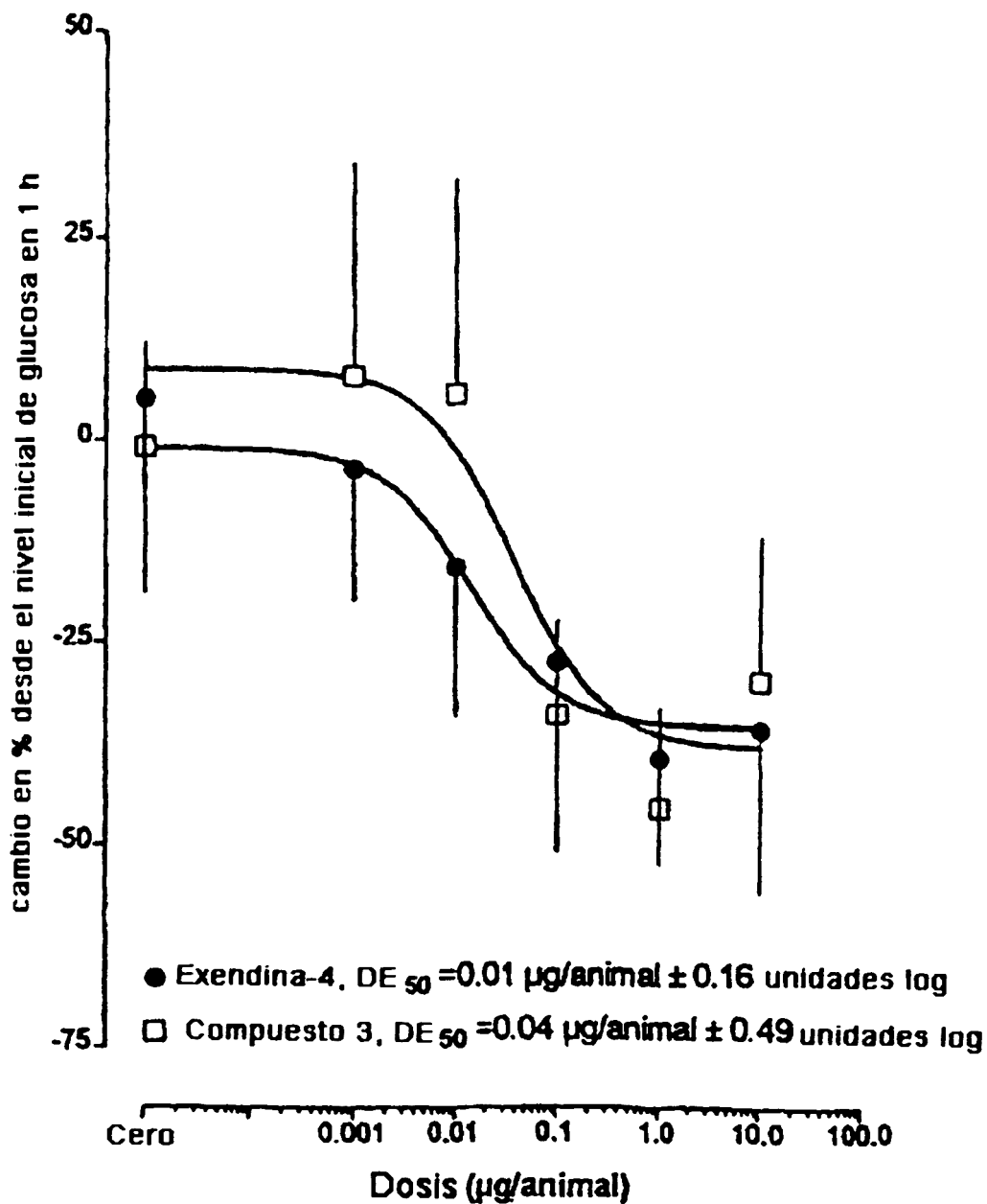
50

55

60

65

**Efecto hipoglucemiante en ratones db/db en puntos de tiempo de 1 h**



**Fig. 1**

COMPUESTO 2  
% RESTANTE EN EL ESTÓMAGO

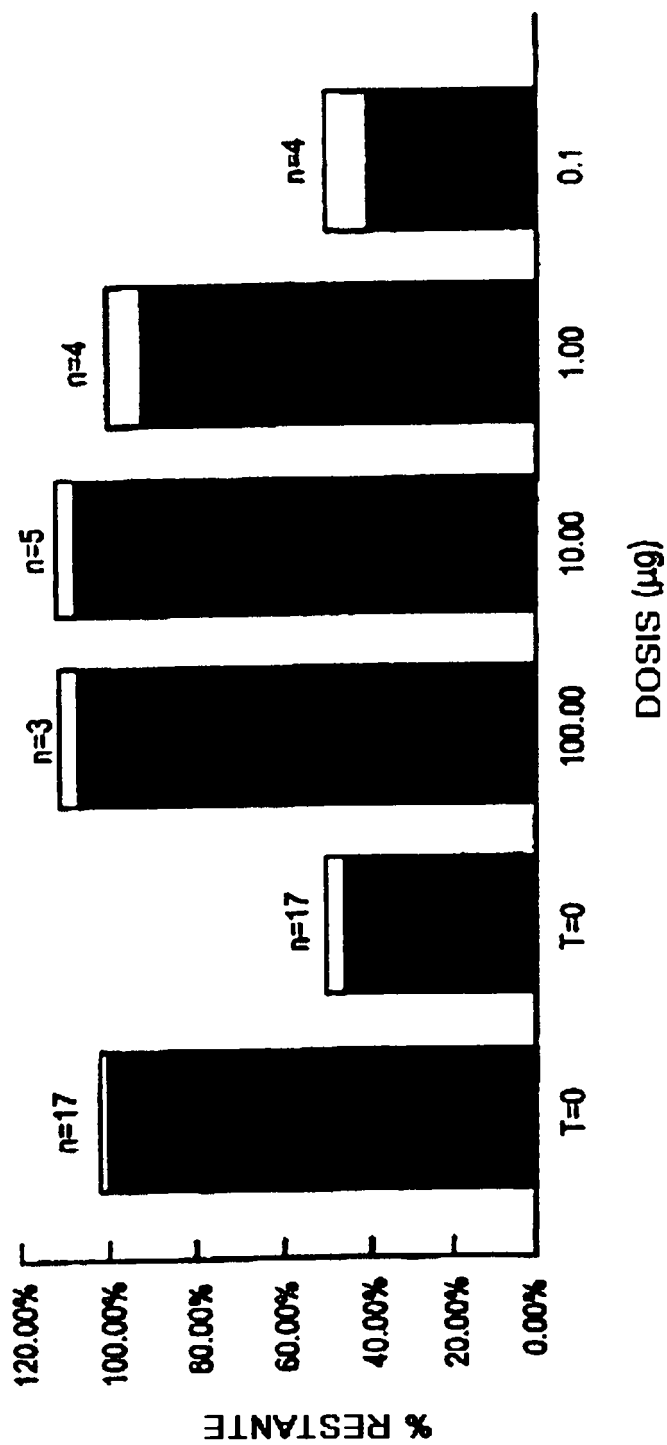
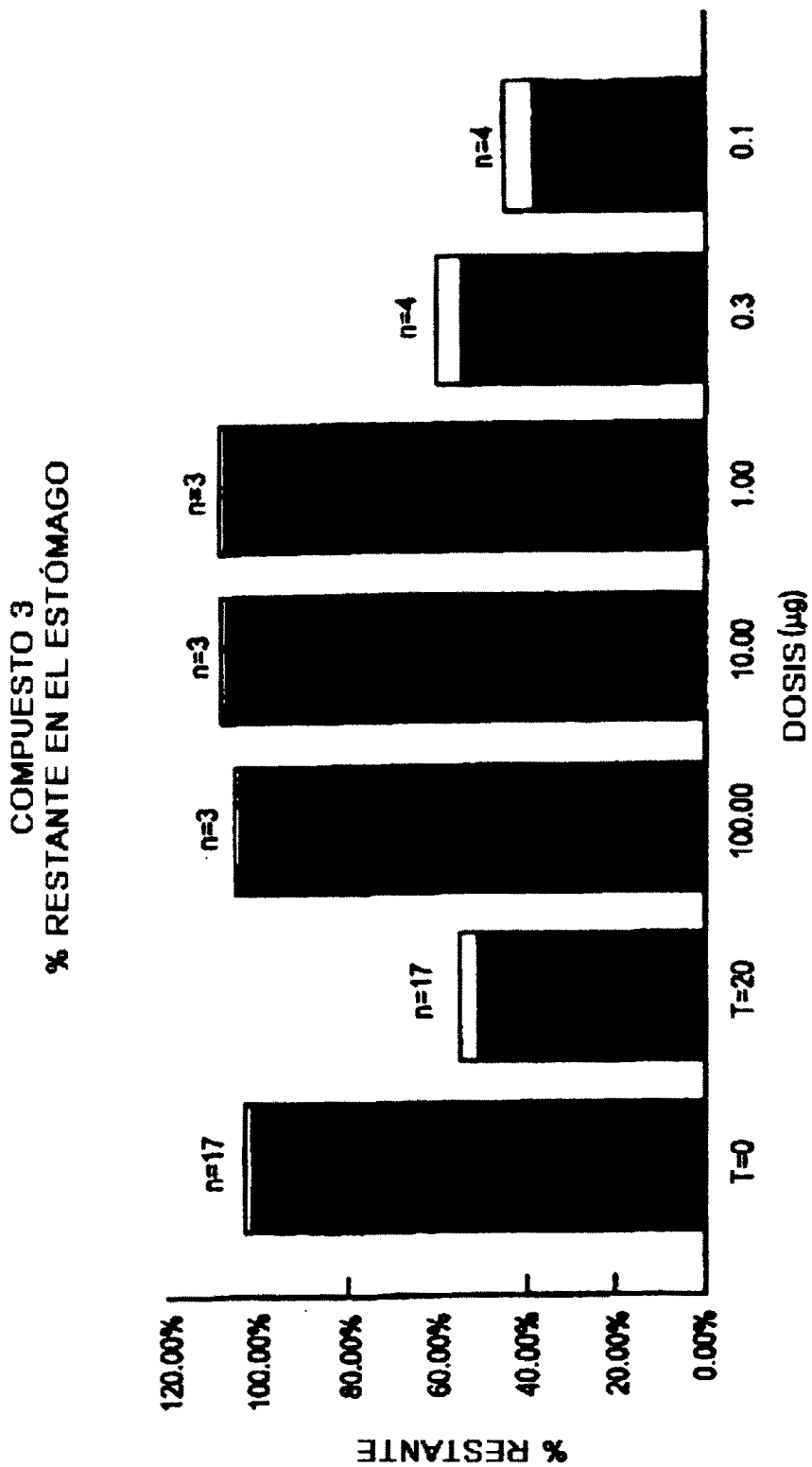


Fig. 2



**Fig. 3**

COMPUESTO 10  
% RESTANTE EN EL ESTÓMAGO

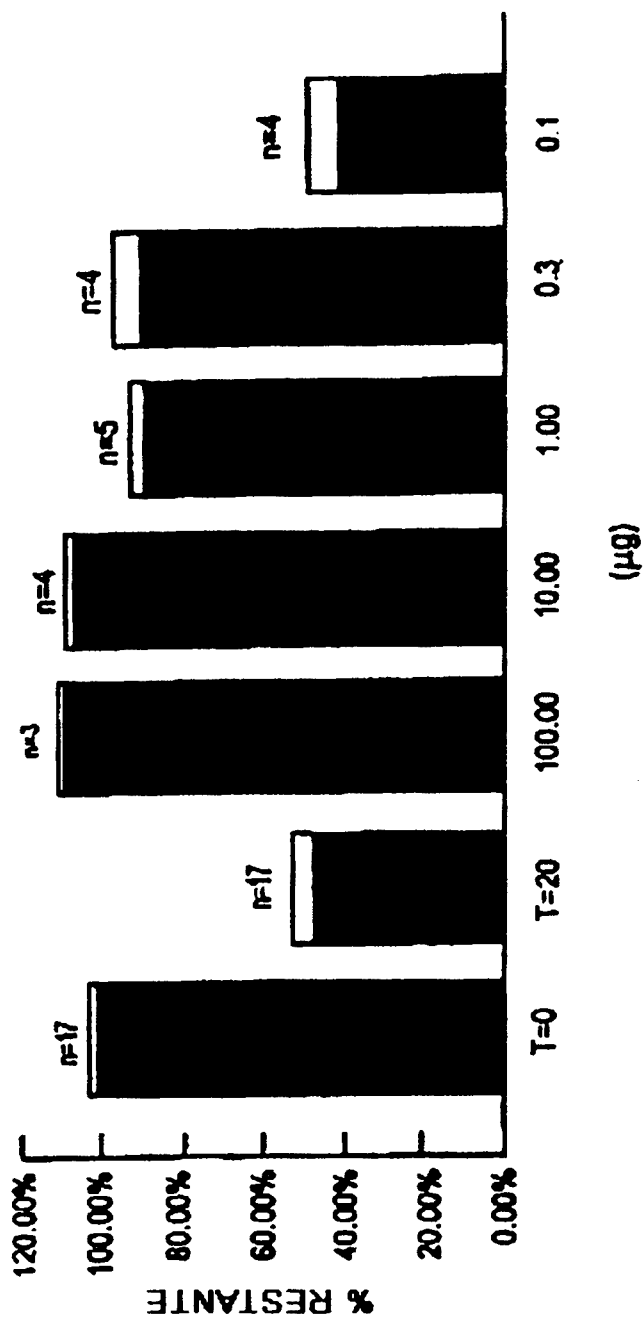
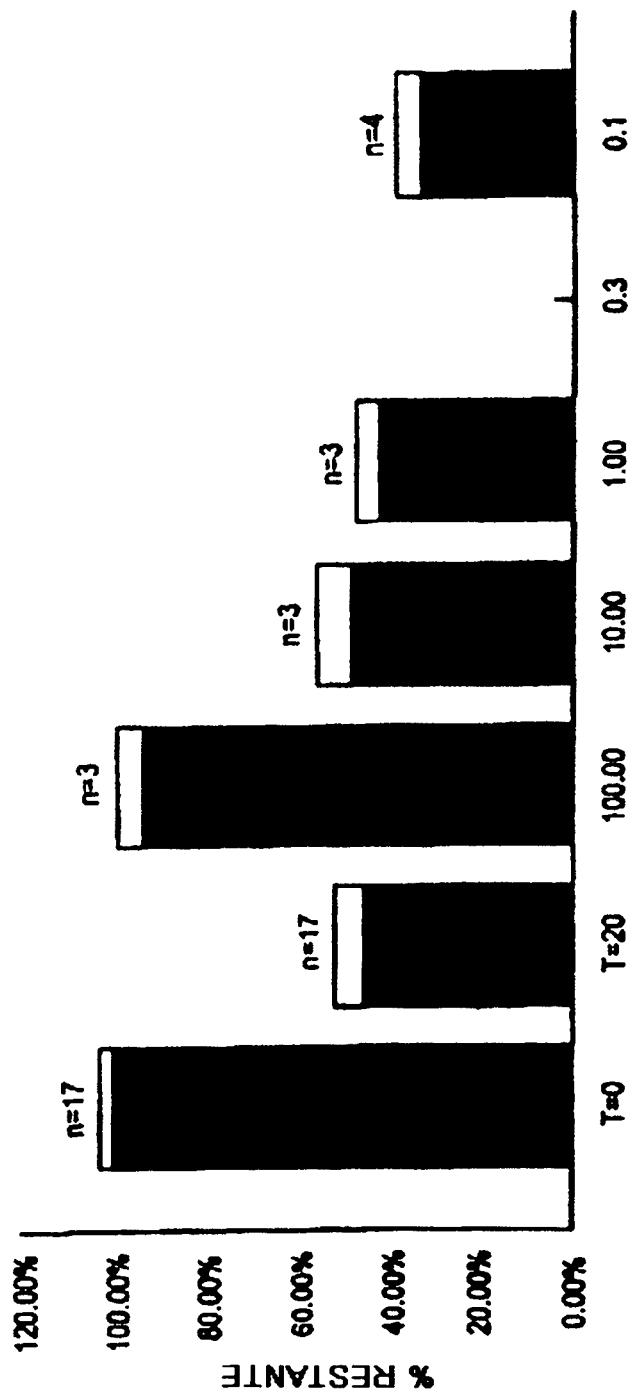


Fig. 4

COMPUESTO 13  
% RESTANTE EN EL ESTÓMAGO



DOSIS (µg)

Fig. 5

# ES 2 294 822 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC.

5 <120> COMPUESTOS NOVEDOSOS DE AGONISTAS DE EXENDINA  
<130> P18555

10 <140> EP 98957897.6  
<141> 12-05-2000

15 <150> PCT/US98/24210  
<151> 13-11-1998

<150> US 60/065.442  
<151> 14-11-1997

20 <160> 74

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0  
Microsoft Word Ver. 98

25 <210> 1  
<211> 39

<212> PRT

30 <213> *Heloderma horridum*

<220>

35 <221> AMIDACIÓN

<222> (39) ... (39)

<223> Ser amidada (serinamida)

40 <400> 1

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

45 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

50 <210> 2

<211> 39

<212> PRT

55 <213> *Heloderma suspectum*

<220>

<221> AMIDACIÓN

60 <222> (39) ... 09)

<223> Ser amidada (serinamida)

65



## ES 2 294 822 T3

<220>

<221> VARIANTE

<222> (21) ... (24)

5 <223> Xaa en posición 21 es Ala o Leu; Xaa en posición 22 es Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa en posición 23 es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met; Xaa en posición 24 es Ala, Glu o Asp;

<220>

10 <221> VARIANTE

<222> (25) ... (28)

<223> Xaa en posición 25 es Ala, Trp, Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa en posición 26 es Ala o Leu; Xaa en posición 27 es Ala o Lys; Xaa en posición 28 es Ala o Asn;

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> (29) ... (29)

20 <223> Xaa en posición 29 es -OH; -NH(2); Gly-Z(2); Gly Gly-Z(2); Gly Gly Xaa(31)-Z(2); Gly Gly Xaa(31) Ser-Z(2); Gly Gly Xaa(31) Ser Ser-Z(2); Gly Gly Xaa(31) Ser Ser Gly-Z(2); Gly Gly Xaa(31) Ser Ser Gly Ala-Z(2); Gly Gly Xaa(31) Ser Ser Gly Ala Xaa(36)-Z(2);

25 <220>

<221> VARIANTE

<222> (29) ... (29)

30 <223> Gly Gly Xaa(31) Ser Ser Gly Ala Xaa(36) Xaa(37)-Z(2); o Gly Gly Xaa(31) Ser Ser Gly Ala Xaa(36) Xaa(37) Xaa(38)-Z(2);

<220>

<221> VARIANTE

35 <222> (29) ... (29)

<223> en la que Xaa(31), Xaa(36), Xaa(37) y Xaa(38) son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquilentilglicina o N-alquilalanina; y Z(2) es -OH o -NH(2);

40 <220>

<221> VARIANTE

<222> (3) ... (28)

45 <223> siempre que no más de tres de Xaa en las posiciones 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27 y 28 sean Ala.

<400> 4

50

```

Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1           5           10           15

Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
          20           25
    
```

55 <210> 5

<211> 30

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

65

<220>

<221> AMIDACIÓN

# ES 2 294 822 T3

<222> (30) ... (30)

<223> Gly amidada (glicinamida)

5 <400> 5

```
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
                20           25           30
```

10

<210> 6

<211> 28

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

<221> AMIDACIÓN

25

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

<400> 6

30

```
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
                20           25
```

35

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

45

<220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

50

<223> Asn amidada (asparaginamida)

<400> 7

55

```
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1           5           10           15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn
                20           25
```

60

<210> 8

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina



# ES 2 294 822 T3

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

5 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

10

<400> 11

15

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ala Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu  
1 5 10 15  
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn  
20 25

20 <210> 12

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

30 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

35

<400> 12

40

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Ala Ser Lys Gln Leu Glu Glu  
1 5 10 15  
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn  
20 25

45 <210> 13

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

55 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (Asparaginamida)

60

<400> 13

65

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ala Lys Gln Leu Glu Glu  
1 5 10 15  
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn  
20 25

## ES 2 294 822 T3

<210> 14  
<211> 28  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

10 <220>  
<221> AMIDACIÓN  
<222> (28) ... (28)  
15 <223> Asn amidada (asparaginamida)

<400> 14

20

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Ala	Gln	Leu	Glu	Glu
1				5				10					15		
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	Leu	Lys	Asn				
			20				25								

25 <210> 15  
<211> 28  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

35 <220>  
<221> AMIDACIÓN  
<222> (28) ... (28)  
40 <223> Asn amidada (asparaginamida)

<400> 15

45

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Ala	Leu	Glu	Glu
1				5				10					15		
Glu	Ala	Val	Arg	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	Leu	Lys	Asn				
			20				25								

50 <210> 16  
<211> 28  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

60 <220>  
<221> AMIDACIÓN  
<222> (28) ... (28)  
65 <223> Asn amidada (asparaginamida)

# ES 2 294 822 T3

<400> 16

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

5

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn  
20 25

<210> 17

<211> 28

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

20 <221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

25 <400> 17

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

30

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn  
20 25

<210> 18

<211> 28

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

<221> AMIDACIÓN

45 <222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

<400> 18

50

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

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn  
20 25

55 <210> 19

<211> 28

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

65

<220>

<221> AMIDACIÓN

## ES 2 294 822 T3

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

5 <400> 19

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

10 Ala Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn  
20 25

<210> 20

<211> 28

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

<221> AMIDACIÓN

25 <222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

<400> 20

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

Glu Ala Ala Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn  
20 25

35 <210> 21

<211> 28

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

45 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

50 <223> Asn amidada (asparaginamida)

<400> 21

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

Glu Ala Val Ala Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn  
20 25

60 <210> 22

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

# ES 2 294 822 T3

<220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

5 <223> Asn amidada (asparaginamida)

<400> 22

10 **His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu**  
**1 5 10 15**  
**Glu Ala Val Arg Ala Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn**  
**20 25**

<210> 23

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

25 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

30 <223> Asn amidada (asparaginamida)

<400> 23

35 **His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu**  
**1 5 10 15**  
**Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Ala Phe Leu Lys Asn**  
**20 25**

<210> 24

40 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

50 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

55 <223> Asn amidada (asparaginamida)

<400> 24

60 **His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu**  
**1 5 10 15**  
**Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Ala Leu Lys Asn**  
**20 25**

<210> 25

65 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial





# ES 2 294 822 T3

<400> 30

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1           5           10
5
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20           25           30
Ser Gly Ala Pro Pro

```

<210> 31

<211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (37) ... (37)

<223> Pro amidada (prolinamida)

<400> 31

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1           5           10           15
30
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20           25           30
Ser Gly Ala Pro Pro
 35

```

<210> 32

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (36) ... (36)

<223> Pro amidada (prolinamida)

<400> 32

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1           5           10           15
55
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20           25           30
60
Ser Gly Ala Pro
 35

```

<210> 33

<211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

## ES 2 294 822 T3

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

5 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (36) ... (36)

<223> Pro amidada (prolinamida)

10

<400> 33

15

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

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

20

Ser Gly Ala Pro  
35

<210> 34

<211> 35

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

<221> AMIDACIÓN

35

<222> (35) ... (35)

<223> Ala amidada (alaninamida)

<400> 34

40

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

45

Ser Gly Ala  
35

<210> 35

50

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

60

<221> AMIDACIÓN

<222> (35) ... (35)

<223> Ala amidada (alaninamida)

65

## ES 2 294 822 T3

<400> 35

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1           5           10           15
5  Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
           20           25           30
    Ser Gly Ala
           35
    
```

10 <210> 36

<211> 34

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

20 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (34) ... (34)

25 <223> Gly amidada (glicinamida)

<400> 36

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1           5           10           15
30  Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
           20           25           30
    Ser Gly
    
```

35 <210> 37

<211> 34

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

45

<220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (34) ... (34)

50 <223> Gly amidada (glicinamida)

<400> 37

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
 1           5           10           15
55  Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
           20           25           30
    Ser Gly
    
```

60

<210> 38

<211> 33

<212> PRT

65 <213> Secuencia artificial

<220>

## ES 2 294 822 T3

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

5 <221> AMIDACIÓN

<222> (33) ... (33)

<223> Ser amidada (serinamida)

10 <400> 38

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

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

Ser

<210> 39

20 <211> 33

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

30 <221> AMIDACIÓN

<222> (33) ... (33)

<223> Ser amidada (serinamida)

35 <400> 39

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

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

Ser

<210> 40

45 <211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

55 <221> AMIDACIÓN

<222> (32) ... (32)

<223> Ser amidada (serinamida)

60

<400> 40

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

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

## ES 2 294 822 T3

- <210> 41  
<211> 32  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina  
10 <220>  
<221> AMIDACIÓN  
15 <222> (32) ... (32)  
<223> Ser amidada (serinamida)
- <400> 41  
20
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Gly | Glu | Gly | Thr | Phe | Thr | Ser | Asp | Leu | Ser | Lys | Gln | Leu | Glu | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Ala | Val | Arg | Leu | Phe | Ile | Glu | Phe | Leu | Lys | Asn | Gly | Gly | Pro | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
- 25 <210> 42  
<211> 31  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina  
35 <220>  
<221> AMIDACIÓN  
40 <222> (31) ... (31)  
<223> Pro amidada (prolinamida)
- <400> 42  
45
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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 |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
- 50 <210> 43  
<211> 31  
<212> PRT  
55 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina  
60 <220>  
<221> AMIDACIÓN  
65 <222> (31) ... (31)  
<223> Pro amidada (prolinamida)

## ES 2 294 822 T3

<400> 43

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

5

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

<210> 44

<211> 30

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

20 <221> AMIDACIÓN

<222> (30) ... (30)

<223> Gly amidada (glicinamida)

25 <400> 44

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

30

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

<210> 45

<211> 29

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

45 <221> AMIDACIÓN

<222> (29) ... (29)

<223> Gly amidada (glicinamida)

50 <400> 45

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

55

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

<210> 46

<211> 29

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

## ES 2 294 822 T3

<220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (29) ... (29)

5 <223> Gly amidada (glicinamida)

<400> 46

10

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu
1				5					10					15	
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn Gly															
			20					25							

15 <210> 47

<211> 38

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

25 <220>

<223> Xaa en las posiciones 31, 36, 37 y 38 representa tioprolina

30 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (38) ... (38)

35 <223> tPro amidada (tioprolinamida)

<400> 47

40

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 Xaa Ser															
			20					25					30		
Ser Gly Ala Xaa Xaa Xaa															
			35												

45 <210> 48

<211> 38

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

<223> Xaa en las posiciones 31, 36, 37 y 38 representa tioprolina

60 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (38) ... (38)

65 <223> tPro amidada (tioprolinamida)

ES 2 294 822 T3

<400> 48

5                   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 Xaa Xaa Xaa  
                                  35

10 <210> 49  
    <211> 37  
    <212> PRT  
15 <213> Secuencia artificial

    <220>  
    <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina  
20 <220>  
    <223> la Ala en posición 31 es N-metil ala.

25 <220>  
    <221> AMIDACIÓN  
    <222> (37) ... (37)  
30 <223> Pro amidada (prolinamida)

<400> 49

35                   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 Ala Ser  
                                  20                                   25                                   30  
40                   Ser Gly Ala Pro Pro  
                                  35

    <210> 50  
    <211> 37  
45 <212> PRT  
    <213> Secuencia artificial

    <220>  
50 <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina  
    <220>  
    <223> la Ala en posición 31, 36 y 37 es N-metil ala.

55 <220>  
    <221> AMIDACIÓN  
    <222> (37) ... (37)  
60 <223> N-metil ala amidada (N-metil alaninamida)

65

## ES 2 294 822 T3

<400> 50

```

5      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 Ala Ser
      20          25          30
      Ser Gly Ala Ala Ala
      35

```

<210> 51

<211> 37

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

<223> Xaa en las posiciones 31, 36 y 37 representa homoprolina

25 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (37) ... (37)

30 <223> hPro amidada (homoprolinamida)

<400> 51

```

35      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 Xaa Ser
      20          25          30
      Ser Gly Ala Xaa Xaa
      35

```

<210> 52

<211> 36

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

55 <223> Xaa en las posiciones 31, 36 y 37 representa homoprolina

<220>

<221> AMIDACIÓN

60 <222> (36) ... (36)

<223> hPro amidada (homoprolinamida)

65

ES 2 294 822 T3

<400> 52

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1           5           10           15
5
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Xaa Ser
          20           25           30
Ser Gly Ala Xaa
          35

```

10 <210> 53

<211> 35

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

20 <220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (35) ... (35)

25 <223> Ala amidada (alaninamida)

<400> 53

```

Arg Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1           5           10           15
30
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
          20           25           30
35
Ser Gly Ala
          35

```

<210> 54

<211> 30

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

50 <221> AMIDACIÓN

<222> (30) ... (30)

<223> Gly amidada (glicinamida)

55 <400> 54

```

His Gly Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1           5           10           15
60
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly
          20           25           30

```

<210> 55

<211> 28

65 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

## ES 2 294 822 T3

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

5 <220>

<223> Xaa en posición 6 representa naftilalanina

<220>

10 <221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

15 <400> 55

20           His Gly Glu Gly Thr Xaa Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu  
              1                                  5                                  10                                  15  
              Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn  
                                  20                                  25

<210> 56

25 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

35 <221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

40 <400> 56

45           His Gly Glu Gly Thr Phe Ser 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  
                                  20                                  25

<210> 57

50 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

60 <221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

65

ES 2 294 822 T3

<400> 57

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

5

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

<210> 58

10 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

20 <221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

25

<400> 58

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

30

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

<210> 59

35 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

45 <223> Xaa en posición 10 representa pentilglicina

<220>

50 <221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

55 <400> 59

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

60

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn  
 20 25

<210> 60

65 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

## ES 2 294 822 T3

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

5 <220>

<223> Xaa en posición 22 representa naftilalanina

<220>

10 <221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

15 <400> 60

```
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu
  1           5           10           15
Glu Ala Val Arg Leu Xaa Ile Glu Phe Leu Lys Asn
      20           25
```

20 <210> 61

25 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

35 <223> Xaa en posición 23 representa terc-butilglicina

<220>

40 <221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

45 <400> 61

```
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 Xaa Glu Trp Leu Lys Asn
      20           25
```

50 <210> 62

<211> 28

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

65 <221> AMIDACIÓN

<222> (28) ... (28)

<223> Asn amidada (asparaginamida)



## ES 2 294 822 T3

<220>

<223> Xaa en las posiciones 31, 36 y 37 representa homoprolina

<220>

5

<221> AMIDACIÓN

<222> (37) ... (37)

<223> hPro amidada (homoprolinamida)

10

<400> 65

15

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Ala Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1          5          10          15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Xaa Ser
          20          25          30
Ser Gly Ala Xaa Xaa
          35
    
```

20

<210> 66

<211> 28

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

30

<220>

<221> VARIANTE

<222> (1) ... (6)

35

<223> Xaa en posición 1 es His, Arg, Tyr o 4-imidazopropionilo; Xaa en posición 2 es Ser, Gly, Ala o Thr; Xaa en posición 3 es Asp o Glu; Xaa en posición 5 es Ala o Thr; Xaa en posición 6 es Ala, Phe, Tyr o naftilalanina;

<220>

40

<221> VARIANTE

<222> (7) ... (12)

<223> Xaa en posición 7 es Thr o Ser; Xaa en posición 8 es Ala, Ser o Thr; Xaa en posición 9 es Asp o Glu; Xaa en posición 10 es Ala, Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met; Xaa en posición 11 es Ala o Ser; Xaa en posición 12 es Ala o Lys;

45

<220>

<221> VARIANTE

50

<222> (13) ... (19)

<223> Xaa en posición 13 es Ala o Gln; Xaa en posición 14 es Ala, Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met; Xaa en posición 15 es Ala o Glu; Xaa en posición 16 es Ala o Glu; Xaa en posición 17 es Ala o Glu; Xaa en posición 19 es Ala o Val;

55

<220>

<221> VARIANTE

<222> (20) ... (22)

60

<223> Xaa en posición 20 es Ala o Arg; Xaa en posición 21 es Ala, Leu o Lys-NH(épsilon)-R en la que R es Lys, Arg, alcanofilo o cicloalcanofilo de cadena lineal o ramificada C(1)-C(10); Xaa en posición 22 es Phe, Tyr o naftilalanina;

65

<220>

<221> VARIANTE

<222> (23) ... (26)



## ES 2 294 822 T3

<222> (27) ... (27)

<223> Asn amidada (asparaginamida)

5 <400> 67

```

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu
 1          5          10          15
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn
                20          25
    
```

10

<210> 68

<211> 27

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

<223> Gly en posición 1 es 4-imidazolilpropionil-Gly. Lys en posición 26 es Lys-NH(épsilon)octanoílo.

25

<220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (27) ... (27)

30

<223> Asn amidada (asparaginamida)

<400> 68

35

```

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu
 1          5          10          15
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Lys Asn
                20          25
    
```

40

<210> 69

<211> 29

<212> PRT

45

<213> Secuencia artificial

<220>

50

<223> secuencia sintetizada artificialmente de compuesto novedoso de agonista de exendina

<220>

<223> Gly en posición 1 es 4-imidazolilpropionil-Gly. Lys en posición 26 es Lys-NH(épsilon)octanoílo.

55

<220>

<221> AMIDACIÓN

<222> (29) ... (29)

60

<223> Gly amidada (glicinamida)

<400> 69

65

```

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp 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
                20          25
    
```





# ES 2 294 822 T3

<400> 74

Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Leu Glu Glu Glu  
1 5 10 15  
Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Phe Leu Asn Lys Gly Gly  
20 25

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65