



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 302 353**

⑮ Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **98920218 .9**

⑯ Fecha de presentación : **06.05.1998**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **0981360**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2000**

⑭ Título: **Procedimiento para prevenir gastritis usando amilina o agonistas de amilina.**

⑯ Prioridad: **06.05.1997 US 851965**

⑬ Titular/es: **AMYLIN PHARMACEUTICALS, Inc.**
9360 Towne Centre Drive
San Diego, California 92121, US

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2008

⑯ Inventor/es: **Young, Andrew;**
Gedulin, Bronislava y
Beynon, Gareth, Wyn

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

⑯ Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 302 353 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

Procedimiento para prevenir gastritis usando amilina o agonistas de amilina.

5 Esta solicitud es una continuación en parte del documento de EE.UU. nº de serie 08/851.965, presentado el 6 de mayo de 1997, correspondiente al documento US-7.101.853.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a procedimientos para tratar o prevenir gastritis o lesión gástrica por administración de una amilina o un agonista de amilina. La presente invención también se refiere al tratamiento de dolor, fiebre, inflamación, artritis, hipercoagulabilidad u otras dolencias para las que estaría indicado un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, que comprende administración de una amilina o un agonista de amilina en conjunción con un fármaco antiinflamatorio no esteroideo. También se describen mediante la presente invención composiciones farmacéuticas que 15 comprenden una amilina o un agonista de amilina y un agente inflamatorio no esteroideo.

Antecedentes

20 Todas las publicaciones y otros materiales que incluyen patentes y solicitudes de patentes se usan simplemente para ilustrar la memoria descriptiva.

Amilina

25 La estructura y la biología de la amilina se han revisado anteriormente. Véase, por ejemplo, Rink y col., *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 14:113-118 (1993); Gaeta y Rink, *Med. Chem. Res.*, 3:483-490 (1994); y Pittner y col., *J. Cell. Biochem.*, 55S:19-28 (1994).

30 La amilina es una hormona de proteínas de 37 aminoácidos. Fue aislada, purificada y caracterizada químicamente como el principal componente de depósitos amiloides en los islotes de páncreas de diabéticos de tipo II humano (Cooper y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU. 84:8628-8632 (1987)). La molécula de amilina tiene dos modificaciones post-traslacionales importantes: el término C está amidado, produciendo tirosinamida como el 37º residuo de aminoácido, y las cisteínas en las posiciones 2 y 7 están reticuladas para formar un residuo de cistina y, así, un bucle N-terminal. La secuencia del marco de lectura abierto del gen de amilina humana muestra la presencia de la señal de escisión proteolítica de aminoácidos dibásicos Lys-Arg, antes del codón N-terminal para Lys, y el Gly antes de la señal proteolítica Lys-Arg en la posición C-terminal, una secuencia típica para amidación para enzima de amidación de proteína, PAM (Cooper y col., *Biochem. Biophys. Acta*, 1014:247-258 (1989)). La amilina es el objeto de la solicitud de patente del Reino Unido nº de serie 8.709.871, presentada el 27 de abril de 1987, y la correspondiente patente de EE.UU. nº 5.367.052, concedida el 22 de noviembre de 1994, y la patente EP nº 289.287.

40 En la diabetes de tipo 1, se ha demostrado que la amilina es deficiente, y se ha propuesto la sustitución combinada con insulina como tratamiento preferido por encima de la insulina en solitario en todas las formas de diabetes. El uso de amilina y otros agonistas de amilina para el tratamiento de diabetes mellitus es el objeto de la patente de Estados Unidos nº 5.175.145, concedida el 29 de diciembre de 1992. Las composiciones farmacéuticas que contienen amilina y amilina más insulina se describen en la patente de Estados Unidos nº 5.124.314, concedida el 23 de junio de 1992.

45 La amilina se sintetiza principalmente en células beta pancreáticas y es secretada en respuesta a estímulos de nutrientes como glucosa y arginina. Los secretagogos de nutrientes como glucosa y arginina estimulan la liberación de amilina, así como insulina. La proporción molar amilina:insulina de las proteínas secretadas varía entre preparados de aproximadamente 0,01 a 0,4, pero parece no variar mucho con estímulos agudos en cualquier preparado. Sin embargo, 50 durante estimulación prolongada por glucosa elevada, la proporción amilina:insulina puede aumentar progresivamente (Gedulin y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180(1):782-789 (1991)). Así, la amilina y la insulina no siempre se secretan en una proporción constante.

55 Se ha descubierto y comunicado que ciertas acciones de la amilina son similares a las acciones no metabólicas de CGRP y calcitonina; sin embargo, las acciones metabólicas de la amilina descubiertas durante investigaciones de esta proteína identificada recientemente parecen reflejar su papel biológico principal. Al menos algunas de estas acciones metabólicas son emuladas por CGRP, si bien a dosis que son acusadamente vasodilatadoras (véase, por ejemplo, Leighton y col., *Nature*, 335:632-635 (1988); Molina y col., *Diabetes*, 39:260-265 (1990)).

60 La primera acción descubierta de la amilina fue la reducción de incorporación estimulada por insulina de glucosa en glucógeno en músculo esquelético en ratas (Leighton y col., *Nature*, 335:632-635 (1988)); el músculo se hizo “insulinoresistente”. El trabajo posterior con músculo sóleo de ratas *ex vivo* e *in vitro* ha indicado que la amilina reduce la actividad de glucógeno-sintasa, promueve la conversión de glucógeno-fosforilasa a partir de la forma b inactiva en la forma a activa, promueve la pérdida neta de glucógeno (en presencia o ausencia de insulina), aumenta los niveles de glucosa-6-fosfato, y puede aumentar la producción de lactato (véase, por ejemplo, Deems y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181(1):116-120 (1991)); Young y col., *FEBS Letts*, 281(1,2):149-151 (1991)). La amilina no parece afectar al transporte de glucosa en sí (por ejemplo, Pittner y col., *FEBS Letts*, 365(1), 98-100 (1995)). Los estudios de relaciones de respuesta a la dosis de amilina e insulina demuestran que la amilina actúa como un antagonista

no competitivo o funcional de insulina en músculo esquelético (Young y col., *Am. J. Physiol.*, 263(2):E274-E281 (1992)). No existe evidencia de que la amilina interfiera con la unión de insulina a sus receptores, o la posterior activación de receptor de insulina tirosincinasa (Follett y col., *Clinical Research*, 39 (1):39A (1991)); Koopmans y col., *Diabetologia*, 34:218-224 (1991)).

5 Se cree que la amilina actúa a través de receptores presentes en membranas de plasma. Los estudios de amilina y CGRP, y el efecto de antagonistas selectivos, sugieren que la amilina actúa por medio de su propio receptor (Beaumont y col., *Br. J. Pharmacol.*, 115(5):713-715 (1995); Wang y col., *FEBS Letts.*, 219:195-198 (1991 b)), contrario a la conclusión de otros investigadores de que la amilina puede actuar principalmente en receptores CGRP (por ejemplo, 10 Chantry y col., *Biochem. J.*, 277:139-143 (1991)), Galeazza y col., *Peptides*, 12:585-591 (1991)); Zhu y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177(2):771-776 (1991)). Los receptores de amilina y su uso en procedimientos para detección 15 selectiva y ensayo de compuestos agonistas y antagonistas de amilina se describen en la patente de Estados Unidos nº 5.264.372, concedida el 23 de noviembre de 1993.

15 Mientras la amilina tiene efectos acusados en metabolismo de combustible hepático *in vivo*, no existe acuerdo general sobre qué acciones de la amilina se observan en hepatocitos aislados o hígado perfundido. Los datos disponibles no sustentan la idea de que la amilina promueve la glucogenólisis hepática, es decir, no actúa como glucagón (por ejemplo, Stephens y col., *Diabetes*, 40:395-400 (1991); Gomez-Foix y col., *Biochem J.*, 276:607-610 (1991)). Se ha sugerido que la amilina puede actuar sobre el hígado para promover la conversión de lactato a glucógeno y para 20 potenciar la cantidad de glucosa capaz de ser liberada por glucagón (véase Roden y col., *Diabetologia*, 35:116-120 (1992)). Es lo más probable que la amilina no tenga efecto directo en las células hepáticas (Pittner, R. A., *Eur. J. of Pharm.* 325:189-197 (1997)).

25 En las células grasas, al contrario que su acción en el músculo, la amilina no tiene acciones detectables en la captación de glucosa estimulada por insulina, la incorporación de glucosa en triglicérido, la producción de CO₂ (Cooper y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:7763-7766 (1988)), la lipólisis estimulada por epinefrina o la inhibición por insulina de lipólisis (Lupien y Young, "Diabetes Nutrition and Metabolism - Clinical and Experimental", Vol. 6(1), páginas 1318 (febrero de 1993)). La amilina ejerce así efectos específicos de tejidos, con acción directa sobre el músculo esquelético, y efectos indirectos (por medio de suministro de sustrato) sobre el hígado, mientras los adipocitos parecen 30 "ciegos" a la presencia o ausencia de amilina.

35 Se ha comunicado también que la amilina puede tener efectos acusados en la secreción de insulina (Young y col., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 84:R1-R5 (1992)). Otros investigadores, sin embargo, han sido incapaces de detectar efectos de la amilina en células β aisladas, en islotes aislados, o en todo el animal (véase Broderick y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177:932-938 (1991) y referencias en el mismo).

40 La amilina o los agonistas de amilina inhiben potenteamente el vaciado gástrico en ratas (Young y col., *Diabetologia* 38(6):642-648 (1995)), perros (Brown y col., *Diabetes* 43 (Supl. 1):172A (1994)) y seres humanos (Macdonald y col., *Diabetologia* 38(Supl. 1):A32 (resumen 118) (1995)). Según se informa, el vaciado gástrico se acelera en ratas BB diabéticas de tipo 1 deficientes en amilina (Young y col., *Diabetologia*, más arriba; Nowak y col., *J. Lab. Clin. Med.*, 123(1):110-6 (1994)) y en ratas tratadas con el antagonista de amilina selectivo, AC187 (Gedulin y col. *Diabetologia*, 38(Supl. 1):A244 (1995)). Los procedimientos para reducir la motilidad gástrica y ralentizar el vaciado gástrico que comprenden la administración de un agonista de amilina (incluyendo amilina) son objeto de la solicitud PCT, Publicación nº WO-95/07.098, publicada el 16 de marzo de 1995. El efecto de la amilina en el vaciado gástrico parece ser 45 fisiológico (operativo en concentraciones que circulan normalmente).

50 Se han estudiado también los niveles suprafisiológicos de amilina, según se informa, en lo que respecta a la inhibición de secreción de ácido gástrico (Guidobono, F., y col., *Peptides* 15:699-702 (1995)) y en lo que respecta a la protección frente a gastritis (Guidobono y col., *Brit. J. Pharm.* 120:581-86 (1997)). Los últimos autores comunicaron que las inyecciones subcutáneas de amilina no tenían efecto en gastritis inducidas por etanol o indometacina en ratas, aunque las inyecciones intracerebroventriculares sí tuvieron un efecto. Los mismos autores concluyeron también que todos los efectos gastroprotectores de la amilina eran distintos de los efectos para inhibir la secreción ácida.

55 Las acciones no metabólicas de amilina incluyen efectos vasodilatadores que pueden estar mediados por la interacción con receptores vasculares de CGRP. Las pruebas *in vivo* comunicadas sugieren que la amilina es al menos de aproximadamente 100 a 1.000 veces menos potente que el CGRP como vasodilatador (Brain y col., *Eur. J. Pharmacol.*, 183:2221 (1990); Wang y col., *FEBS Letts.*, 291:195-198 (1991)). Se ha comunicado el efecto de amilina en acciones hemodinámicas regionales, incluyendo el flujo sanguíneo renal, en ratas conscientes (Gardiner y col., *Diabetes*, 40:948-951 (1991)). Los autores de la invención observaron que la infusión de amilina en ratas se asoció con mayor vasodilatación renal y menor vasoconstricción mesentérica que la que se observa con infusión de α -CGRP humano. Concluyeron que, promoviendo la hiperemia renal en una mayor medida que lo hizo el α -CGRP, la amilina en ratas podría causar menor estimulación acusada que el sistema de renina-angiotensina, y así, menor vasoconstricción mediada por angiotensina II secundaria. También se observó, sin embargo, que durante la coninfusión de α -^{8,37}CGRP humano y amilina en ratas, las vasoconstricciones renales y mesentéricas estaban no enmascaradas, presumiblemente debido a efectos de vasoconstrictor sin oposición de angiotensina II, y que este hallazgo es similar al observado 60 durante coinfusión de α -CGRP humano y α -^{8,37}CGRP humano (id. en 951).

5 Inyectada en el encéfalo, o administrada periféricamente, se ha comunicado que la amilina suprime la ingestión de alimento, por ejemplo, Chance y col., *Brain Res.*, 539:352-354 (1991), una acción compartida con CGRP y calcitonina. Se ha comunicado también que la amilina tiene efectos tanto en osteoclastos aislados en los que causó quiescencia celular, como *in vivo* en lo que se comunicó un descenso en calcio en el plasma de hasta el 20% en ratas, en conejos y en seres humanos con enfermedad de Paget (véase, por ejemplo, Zaidi y col., *Trends in Endocrinol. and Metab.*, 4:255-259 (1993)). A partir de los datos disponibles, la amilina parece ser menos potente que la calcitonina humana para estas acciones. De modo interesante, se comunicó que la amilina parecía aumentar la producción cAMP de osteoclastos pero sin aumentar el Ca^{2+} citosólico, mientras la calcitonina hace ambas cosas (Alam y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179(1), 134-139 (1991)). Se sugirió, aunque no se estableció, que la calcitonina puede actuar 10 por medio de dos tipos de receptores y que la amilina puede interaccionar con uno de ellos.

15 También se ha descubierto que, sorprendentemente a la vista de sus propiedades vasodilatadoras renales y otras descritas anteriormente, la amilina aumenta acusadamente la actividad de renina en plasma en ratas intactas cuando se suministra por vía subcutánea de una manera que evita cualquier trastorno en la presión arterial. Este último punto es importante porque la reducción de la presión arterial es un estímulo intenso para la liberación de renina. Los antagonistas de amilina, como antagonistas de receptores de amilina, que incluyen los selectivos para receptores de amilina en comparación con CGRP y/o receptores de calcitonina, pueden usarse para bloquear el ascenso evocado por amilina de la actividad de renina en plasma. El uso de antagonistas de amilinas para tratar trastornos relacionados con la renina se describe en la patente de Estados Unidos nº 5.376.638, concedida el 27 de diciembre de 1994.

20 25 Se ha encontrado también que la amilina y los agonistas de amilina tienen un efecto analgésico; se describen procedimientos para tratar el dolor que comprenden la administración de una amilina o un agonista de amilina con o sin un analgésico narcótico u otro agente para aliviar el dolor en la patente de EE.UU. nº 5.677.279, concedida el 14 de octubre de 1997.

30 35 En seres humanos normales, se han comunicado niveles de amilina en ayunas de 1 a 10 pM y niveles posprandiales o posglucosa de 5 a 20 pM (por ejemplo, Hartter y col., *Diabetologia*, 34:52-54 (1991); Sanke y col., *Diabetologia*, 34:129-132 (1991); Koda y col., *The Lancet*, 339:1179-1180 (1992)). En individuos obesos insulinoresistentes, los niveles de amilina poscomida pueden elevarse, alcanzando hasta aproximadamente 50 pM. En comparación, los valores para insulina en ayunas y posprandial son de 20 a 50 pM, y de 100 a 300 pM respectivamente en personas sanas, con tal vez de 3 a 4 veces niveles más altos en personas insulinoresistentes. En diabetes de tipo 1, en la que se destruyen células beta, los niveles de amilina están en o por debajo de los niveles de detección y no aumentan en respuesta a glucosa (Koda y col., *The Lancet*, 339:1179-1180 (1992)). En ratones y ratas normales, se han comunicado niveles basales de amilina de 30 a 100 pM, mientras que se han medido valores de hasta 600 pM en ciertas cepas diabéticas insulinoresistentes de roedores (por ejemplo, Huang y col., *Hypertension*, 19:I-101-I-109 (1991); Gill y col., *Life Sciences*, 48:703-710(1991)).

Gastritis

40 La gastritis es la inflamación de la mucosa gástrica. La dolencia no refleja una sola enfermedad. Al contrario, es común dentro de un grupo de trastornos que tienen cambios inflamatorios en la mucosa gástrica, pero que pueden tener diferentes rasgos clínicos, características histológicas y patogénesis. Las dos formas principales de gastritis, que constituyen diferentes entidades clínicas, son gastritis aguda y gastritis crónica. *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Wilson y col., ed., 12^a ed. 1991, McGraw-Hill, Inc.) en páginas 1244-1248.

45 50 La principal, y ciertamente la más llamativa, forma de gastritis aguda es la gastritis hemorrágica aguda, que se refiere también como gastritis erosiva aguda. Estos términos reflejan el sangrado de la mucosa gástrica encontrado casi invariablemente en esta forma de gastritis y la pérdida característica de integridad de la mucosa gástrica (erosión) que acompaña a la lesión inflamatoria. Se ha estimado que la gastritis erosiva se produce en hasta el 80 al 90% de pacientes hospitalizados en estado crítico. Se encuentra con la máxima frecuencia en pacientes en unidades de cuidados intensivos médicos o quirúrgicos con traumatismo grave, cirugía importante, insuficiencia hepática, renal o respiratoria, shock, quemaduras masivas o infecciones graves con septicemia.

55 60 Se conocen varios agentes que dañan la mucosa gástrica. Entre ellos se incluyen la aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), ácidos biliares, enzimas pancreáticos y etanol. Estos agentes rompen la barrera de la mucosa gástrica, que en condiciones normales impide la retrodifusión de iones de hidrógeno desde la luz gástrica a la mucosa (a pesar y en contra de un enorme gradiente de concentración de H⁺). La causa más común y muy importante de gastritis erosiva aguda asociada a fármacos es la ingestión de aspirina u otros NSAID. Esos fármacos inhiben la actividad de ciclooxygenasa de la mucosa gástrica, reduciendo con ello la síntesis y los niveles tisulares de prostaglandinas de mucosa endógenas, que parecen desempeñar papeles importantes en la defensa de la mucosa. Se piensa que esta reducción en las prostaglandinas tisulares es un mecanismo principal, pero tal vez no el exclusivo, por el que la aspirina y otros NSAID dañan la mucosa gástrica.

65 Las dos formas principales de gastritis crónica se han clasificado como tipo A y B basándose en sus distribuciones en la mucosa gástrica acoplada con algunas implicaciones relativas a su patogénesis. La gastritis de tipo A es la forma menos común de gastritis crónica; implica de modo característico el cuerpo y fondo del estómago con escasez relativa del antró. La gastritis de tipo B es la forma más común de gastritis crónica. En pacientes jóvenes, la gastritis de tipo B implica principalmente el antró, mientras en los pacientes mayores está afectado todo el estómago.

Fármacos antiinflamatorios no esteroideos

Los fármacos o agentes antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) son analgésicos útiles, sin embargo, tienen la propiedad adversa de inducir diversos efectos gástricos en una gran fracción de pacientes; dichos efectos gástricos incluyen gastritis, úlcera gástrica, malestar epigástrico, náuseas, vómitos y hemorragia (Woodbury, D.M. y Fingl, E. *Analgesic-antipyretics, anti-inflammatory agents, and drugs employed in the therapy of gout*, en *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Goodman, L.S., y Gilman, A., ed.) 325-43 (1975)). El efecto secundario más común de los NSAID es una propensión a inducir úlceras gástricas o intestinales que a veces pueden acompañarse de anemia por la pérdida de sangre resultante. Los pacientes que usan NSAID sobre una base crónica tienen aproximadamente tres veces más riesgo relativo de sufrir episodios gastrointestinales adversos serios en comparación con quienes no los usan (Gabriel y col., "Risk for serious gastrointestinal complications related to the use of nonsteroidal antiinflammatory fármacos. A meta analysis", *Ann. Intern. Med.* 115:1117-1125 (1991)). El daño gástrico por estos agentes puede desencadenarse al menos por dos mecanismos distintos: difusión de ácido en la mucosa gástrica que induce daño tisular; e interferencia con la biosíntesis de prostaglandinas gástricas que sirven como agentes citoprotectores en la mucosa gástrica. Estos efectos secundarios son un problema particularmente en pacientes que deben ingerir NSAID continuamente, como en pacientes con dolencias inflamatorias crónicas, como artritis reumatoide. Los NSAID incluyen salicilatos; derivados de para-aminofenol, como paracetamol; indometacina; sulindac; etodolac; fenamatos; telmetina; cеторолак; diclofenac; derivados propiónicos, como ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, fenoprofeno, cetoprofeno, flurbiprofeno y oxaprozina; piroxicam; derivados de pirazolona, como fenilbutazona; y apazona. Goodman & Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Capítulo 27 (9^a ed.), McGraw-Hill 1996.

Resumen de la invención

Los autores de la invención han descubierto que, inesperadamente, las amilinas y ciertos agonistas de amilina tienen propiedades gastroprotectoras y pueden prevenir la inducción de gastritis, y así tratar o prevenir lesión gástrica, como úlceras gástricas, cuando se administran a un sujeto, por una ruta seleccionada a partir del grupo que consiste en administración subcutánea, intravenosa, nasal, oral, pulmonar, transdérmica y bucal. Se entiende que el término "amilina" incluye compuestos como los definidos por Young y Cooper en la patente de EE.UU. 5.234.906, concedida el 10 de agosto de 1993 para "composiciones hiperglucémicas". Por ejemplo, el término incluye amilina humana y variaciones de especies de ella, referidas como amilina y secretadas a partir de las células beta del páncreas. "Agonista de amilina" es también un término conocido en la técnica. El término se refiere a compuestos que emulan los efectos de la amilina. Los agonistas de amilina incluyen "análogos de agonistas de amilina" que son derivados de amilina que actúan como agonistas de amilina. Los agonistas de amilina pueden actuar mediante unión u otra interacción directa o indirecta con un receptor de amilina u otro receptor con el que la amilina en sí puede interaccionar para provocar efectos biológicos de la amilina. Además de aquellos agonistas de amilina descritos en la presente memoria descriptiva, se identifican otros agonistas de amilina útiles en la patente de EE.UU. nº 5.686.411, concedida el 11 de noviembre de 1997.

Así, en un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la gastritis o úlcera gástrica en un sujeto, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una amilina o ciertos agonistas de amilina, en el que dicho agonista de amilina no es una calcitonina y dicha amilina o agonista de amilina se administra por una ruta seleccionada a partir del grupo que consiste en administración subcutánea, intravenosa, nasal, oral, pulmonar, transdérmica y bucal. Por "calcitonina" se entiende la hormona peptídica humana calcitonina y variaciones de especies de ella, como calcitonina de rata, calcitonina de salmón y calcitonina de anguila. En una forma de realización, dicha gastritis o úlcera gástrica se asocia con la administración de un fármaco antiinflamatorio no esteroideo.

En los procedimientos de la presente invención, los efectos gastroprotectores de las amilinas y agonistas de amilina reducirán la propensión de los NSAID a causar gastritis y úlceras.

Así, en otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una dolencia para la cual estaría indicado un NSAID que comprende la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una amilina o ciertos agonistas de amilina, en el que dicho agonista de amilina no es una calcitonina y dicha amilina o agonista de amilina se administra por una ruta seleccionada a partir del grupo que consiste en administración subcutánea, intravenosa, nasal, oral, pulmonar, transdérmica y bucal, y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antiinflamatorio no esteroideo. Preferentemente, dicho agente antiinflamatorio no esteroideo se selecciona entre el grupo que consiste en salicilato, acetaminofeno, fenacetina, naproxeno, fenilbutazona, indometacina, ibuprofeno, sulandac, etodolac, fenamatos, telmetina, cеторолак, diclofenac, fenoprofeno, cetoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, piroxicam y apazona.

Según los procedimientos de la presente invención, la amilina o agonista de amilina se administra por vía oral, intravenosa, subcutánea, nasal, pulmonar, transdérmica o bucal. En la actualidad se prefieren la administración intravenosa y subcutánea.

El sujeto puede ser cualquier animal, preferentemente un mamífero, y más preferentemente un ser humano.

ES 2 302 353 T3

Se describe también una composición farmacéutica que comprende (1) una amilina o un agonista de amilina o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en el que dicho agonista de amilina no es una calcitonina, y (2) un agente antiinflamatorio no esteroideo en un vehículo y dosis farmacéuticamente aceptables.

5 El agente inflamatorio no esteroideo se selecciona entre el grupo que consiste, por ejemplo, en salicilato, acetaminofeno, fenacetina, naproxeno, fenilbutazona, indometacina, ibuprofeno, sulandac, etudolac, fenamatos, telmetina, cеторалак, distofenac, fenoprofeno, cetoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, piroxicam y apazona.

10 En formas de realización preferidas de la presente invención, el agonista de amilina es ^{25,28,29}Pro-h-amilina, también conocido como pramlintida. La pramlintida se describe y reivindica en la patente de Estados Unidos nº 5.686.411, concedida el 11 de noviembre de 1997.

Breve descripción de los dibujos

15 La invención se describirá adicionalmente con referencia al dibujo adjunto en el que:

la fig. 1 muestra el efecto de dosis subcutáneas de amilina en ratas para reducir la lesión gástrica inducida por alimentación por sonda de etanol en ratas.

20 Descripción detallada de la invención

Los agonistas de amilina pueden identificarse por actividad en los ensayos de gastroprotección descritos más adelante. Estos compuestos pueden evaluarse también por ensayos de unión a receptores y vaciado gástrico descritos más adelante.

25 La nomenclatura de los diversos compuestos de agonistas de amilina útiles en la presente invención puede usarse para indicar tanto el péptido en el que se basa la secuencia como las modificaciones realizadas a cualquier secuencia de amilina peptídica básica, como amilina humana. Un aminoácido precedido por un número en superíndice indica que el aminoácido nombrado sustituye al aminoácido normalmente presente en la posición de aminoácido del superíndice 30 en la secuencia de aminoácidos básica. Por ejemplo, “¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina” se refiere a un péptido basado en la secuencia de “h-amilina” o “amilina humana” que tiene los siguientes cambios: Arg sustituyendo a His en el residuo 18, Pro sustituyendo a Ala en el residuo 25 y Pro sustituyendo a Ser en el residuo 28. El término “des-¹Lys-h-amilina” se refiere a un péptido basado en la secuencia de amilina humana, con el primer aminoácido, o N-terminal, suprimido.

35 Los agonistas de amilina incluyen los siguientes análogos de agonistas de amilina:

i) Un análogo de agonista de amilina que tiene la secuencia de aminoácidos:

40 ¹A₁-X-Asn-Thr-⁵Ala-Thr-Y-Ala-Thr-¹⁰Gln-Arg-Leu-B₁-Asn- ¹⁵Phe-Leu-C₁-D₁-E₁-²⁰F₁-G₁-Asn-H₁-Gly-²⁵Pro-I₁-Leu-Pro-J₁-³⁰Thr-K₁-Val-Gly-Ser-³⁵Asn-Thr-Tyr-Z

en la que

45 A₁ es Lys, Ala, Ser o hidrógeno;

B₁ es Ala, Ser o Thr;

C₁ es Val, Leu o Ile;

50 D₁ es His o Arg;

E₁ es Ser o Thr;

F₁ es Ser, Thr, Gln o Asn;

55 G₁ es Asn, Gln o His;

H₁ es Phe, Leu o Tyr;

60 I₁ es Ile, Val, Ala o Leu;

J₁ es Ser, Pro o Thr;

65 K₁ es Asn, Asp o Gln;

X e Y son residuos seleccionados independientemente que tienen cadenas laterales que están químicamente enlazadas entre sí para formar una unión intramolecular, en los que dicha unión intramolecular comprende un enlace de disulfuro, una lactama o una unión de tioéter; y Z es amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino,

ES 2 302 353 T3

5 aralquilamino, alquilogi, ariloxi o aralquilogi; y siempre que A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Val, J₁ es Pro y K₁ es Asn; entonces uno o más de A₁ a K₁ es un aminoácido D y Z se selecciona entre el grupo que consiste en alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquilogi, ariloxi o aralquilogi.

10 5) ii) Un análogo de agonista de amilina que tiene la secuencia de aminoácidos:

15 ¹A₁-X-Asn-Thr-⁵Ala-Thr-Y-Ala-Thr-¹⁰Gln-Arg-Leu-B₁-Asn-¹⁵Phe-Leu-C₁-D₁-E₁-²⁰F₁-G₁-Asn-H₁-Gly-²⁵Pro-I₁-Leu-J₁-Pro-³⁰Thr-K₁-Val-Gly-Ser-³⁵Asn-Thr-Tyr-Z

20 en la que

A₁ es Lys, Ala, Ser o hidrógeno;

25 B₁ es Ala, Ser o Thr;

C₁ es Val, Leu o Ile;

30 D₁ es His o Arg;

E₁ es Ser o Thr;

F₁ es Ser, Thr, Gln o Asn;

35 G₁ es Asn, Gln o His;

H₁ es Phe, Leu o Tyr;

I₁ es Ile, Val, Ala o Leu;

40 J₁ es Ser, Pro, Leu, Ile o Thr;

K₁ es Asn, Asp o Gln;

45 X y Y son residuos seleccionados independientemente que tienen cadenas laterales que están químicamente enlazadas entre sí para formar una unión intramolecular, en los que dicha unión intramolecular comprende un enlace de disulfuro, una lactama o una unión de tioéter; y Z es amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquilogi, ariloxi o aralquilogi; y siempre que

50 (a) A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Val, J₁ es Pro y K₁ es Asn; o

55 (b) A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es His, E₁ es Ser, F₁ es Asn, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Val, J₁ es Ser y K₁ es Asn;

60 entonces uno o más de A₁ a K₁ es un aminoácido D y Z se selecciona entre el grupo que consiste en alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquilogi, ariloxi o aralquilogi.

65 5) iii) Un análogo de agonista de amilina que tiene la secuencia de aminoácidos:

50 ¹A₁-X-Asn-Thr-⁵Ala-Thr-Y-Ala-Thr-¹⁰Gln-Arg-Leu-B₁-Asn-¹⁵Phe-Leu-C₁-D₁-E₁-²⁰F₁-G₁-Asn-H₁-Gly-²⁵I₁-J₁-Leu-Pro-Pro-³⁰Thr-K₁-Val-Gly-Ser-³⁵Asn-Thr-Tyr-Z

55 en la que

A₁ es Lys, Ala, Ser o hidrógeno;

B₁ es Ala, Ser o Thr;

60 C₁ es Val, Leu o Ile;

D₁ es His o Arg;

E₁ es Ser o Thr;

65 F₁ es Ser, Thr, Gln o Asn;

G₁ es Asn, Gln o His;

ES 2 302 353 T3

H₁ es Phe, Leu o Tyr;

I₁ es Ala o Pro;

5 J₁ es Ile, Val, Ala o Leu;

K₁ es Asn, Asp o Gln;

10 X e Y son residuos seleccionados independientemente que tienen cadenas laterales que están químicamente enlazadas entre sí para formar una unión intramolecular, en los que dicha unión intramolecular comprende un enlace de disulfuro, una lactama o una unión de tioéter; y Z es amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquiloglioxi, ariloglioxi o aralquiloglioxi; y siempre que A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Pro, J₁ es Val y K₁ es Asn; entonces uno o más de A₁ a K₁ es un aminoácido D y Z se selecciona entre el grupo que consiste en alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, 15 alquiloglioxi, ariloglioxi o aralquiloglioxi.

iv) Un análogo de agonista de amilina que tiene la secuencia de aminoácidos:

1 A₁-X-Asn-Thr-⁵Ala-Thr-Y-Ala-Thr-¹⁰Gln-Arg-Leu-B₁-Asn-¹⁵Phe-Leu-C₁-D₁-E₁-²⁰F₁-G₁-Asn-H₁-Gly-²⁵Pro-I₁-
20 Leu-Pro-Pro-³⁰Thr-J₁-Val-Gly-Ser-³⁵Asn-Thr-Tyr-Z

en la que

25 A₁ es Lys, Ala, Ser o hidrógeno;

B₁ es Ala, Ser o Thr;

30 C₁ es Val, Leu o Ile;

D₁ es His o Arg;

E₁ es Ser o Thr;

35 F₁ es Ser, Thr, Gln o Asn;

G₁ es Asn, Gln o His;

H₁ es Phe, Leu o Tyr;

40 I₁ es Ile, Val, Ala o Leu;

J₁ es Asn, Asp o Gln;

45 X e Y son residuos seleccionados independientemente que tienen cadenas laterales que están químicamente enlazadas entre sí para formar una unión intramolecular en los que dicha unión intramolecular comprende un enlace de disulfuro, una lactama o una unión de tioéter; y Z es amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquiloglioxi, ariloglioxi o aralquiloglioxi; y siempre que A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Val y J₁ es Asn; entonces uno o más de A₁ a K₁ es un aminoácido D y Z se selecciona entre el grupo que consiste en alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, 50 alquiloglioxi, ariloglioxi o aralquiloglioxi.

Los compuestos de agonistas de amilina preferidos, des-¹Lys-h-amilina, ^{25,28,29}Pro-h-amilina, ¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina y des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, muestran todos actividad de amilina *in vivo* en animales de prueba tratados. Además de los que tienen actividades características de amilina, se ha encontrado también que ciertos compuestos preferidos poseen características más deseables de solubilidad y estabilidad cuando se comparan con amilina humana. Estos compuestos preferidos incluyen ²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina, ^{25,28,29}Pro-h-amilina y ¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina.

Los procedimientos de la presente invención emplean una amilina o un agonista de amilina, por ejemplo, agonistas receptores de amilina como ¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, ¹⁸Arg^{25-28,29}Pro-h-amilina, des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28,29}Pro-h-amilina, ^{25,28-29}Pro-h-amilina, des-¹Lys^{25,28,29}Pro-h-amilina y ²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina. Los ejemplos de otros agonistas de amilina adecuados incluyen:

23Leu²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina;

65 23Leu²⁵Pro²⁶Val²⁸Pro-h-amilina;

des-¹Lys²³Leu²⁵Pro²⁶Val²⁸Pro-h-amilina;

ES 2 302 353 T3

18 Arg²³Leu²⁵Pro²⁶Val²⁸Pro-h-amilina;

18 Arg²³Leu^{25,28,29}Pro-h-amilina;

5 18 Arg²³Leu^{25,28}Pro-h-amilina;

17 Ile²³Leu^{25,28,29}Pro-h-amilina;

10 17 Ile^{25,28,29}Pro-h-amilina;

des-¹Lys¹⁷Ile²³Leu^{25,28,29}Pro-h-amilina;

17 Ile¹⁸Arg²³Leu-h-amilina;

15 17 Ile¹⁸Arg²³Leu²⁶Val²⁹Pro-h-amilina;

17 Ile¹⁸Arg²³Leu²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina;

13 Thr²¹His²³Leu²⁶Ala²⁸Leu²⁹Pro³¹Asp-h-amilina;

20 13 Thr²¹His²³Leu²⁶Ala²⁹Pro³¹Asp-h-amilina;

des-¹Lys¹³Thr²¹His²³Leu²⁶Ala²⁸Pro³¹Asp-h-amilina;

25 13 Thr¹⁸Arg²¹His²³Leu²⁶Ala²⁹Pro³¹Asp-h-amilina;

13 Thr¹⁸Arg²¹His²³Leu^{28,29}Pro³¹Asp-h-amilina; y,

13 Thr¹⁸Arg²¹His²³Leu²⁵Pro²⁶Ala^{28,29}Pro³¹Asp-h-amilina.

30

Se desvelan todavía más agonistas de amilina, incluyendo análogos de agonistas de amilina, y se especifican además procedimientos para preparar y usar agonistas de amilina en la patente de EE.UU. de propiedad común nº 5.686.411, concedida el 11 de noviembre de 1997.

35

La actividad de agonistas de amilina puede evaluarse usando ciertos ensayos biológicos descritos en la presente memoria descriptiva. El ensayo de unión a receptor puede identificar agonistas y antagonistas de amilina candidatos y puede usarse para evaluar la unión, mientras el ensayo de vaciado gástrico en ratas puede usarse para distinguir entre agonistas y antagonistas de amilina. Preferentemente, los compuestos agonistas exhiben en el ensayo de unión a receptor en el orden de menos de aproximadamente 1 a 5 nM, preferentemente menos de aproximadamente

40

1 nM y más preferentemente menos de aproximadamente 50 pM. En el ensayo de vaciado gástrico de ratas *in vivo*, estos compuestos muestran preferentemente valores de DE₅₀ en el orden de menos de aproximadamente 100 a 1.000 µg/rata.

45

El ensayo de unión a receptor se describe en la patente de Estados Unidos nº 5.264.372, concedida el 23 de noviembre de 1993. El ensayo de unión a receptor es un ensayo de competencia que mide la capacidad de los compuestos de unirse específicamente a receptores de amilina unidos por membrana. Una fuente preferida de los preparados de membrana usados en el ensayo es el prosencéfalo basal que comprende membranas del nucleus accumbens y regiones circundantes. Los compuestos que se están sometiendo a ensayo compiten por unirse a estos preparados de receptor con amilina en ratas ¹²⁵I Bolton Hunter. Las curvas de competencia, en las que se representa la cantidad unida (B) en función del logaritmo de la concentración de ligando, son analizadas por ordenador usando análisis por regresión no lineal a una ecuación logística de 4 parámetros (programa Inplot; GraphPAD Software, San Diego, California) o el programa ALLFIT de DeLean y col. (ALLFIT, Versión 2.7 (NIH, Bethesda, MD 20892)). Munson, P. y Rodbard, D., Anal. Biochem. 107:220-239 (1980).

55

Las amilinas o agonistas de amilina pueden identificarse, evaluarse o detectarse selectivamente por su efecto en el vaciado gástrico usando los procedimientos descritos, por ejemplo, en la solicitud PCT, Publicación nº WO-95/07.098 u otros procedimientos conocidos en la técnica o equivalentes para determinar la motilidad gástrica. Uno de estos procedimientos para su uso en la identificación o evaluación de la capacidad de un compuesto por ralentizar la motilidad gástrica comprende: (a) reunión de una muestra de prueba y un sistema de prueba, comprendiendo dicha muestra de prueba uno o más compuestos de prueba, y comprendiendo dicho sistema de prueba un sistema para evaluar la motilidad gástrica, estando dicho sistema caracterizado porque exhibe, por ejemplo, una etiqueta de plasma elevado en respuesta a la introducción intragástrica a dicho sistema de esa etiqueta; y, (b) determinación de la presencia o cantidad de un ascenso en la etiqueta de plasma en dicho sistema. Pueden usarse asimismo controles positivos y/o negativos. Opcionalmente, puede añadirse al sistema de prueba una cantidad predeterminada de antagonista de amilina (por ejemplo, ^{8,32}calcitonina de salmón).

Los agonistas de amilina como los descritos anteriormente se preparan usando técnicas estándar de síntesis de péptidos sólidos y preferentemente un sintetizador de péptidos automatizado o semiautomatizado. Normalmente, se

ES 2 302 353 T3

acoplan un aminoácido protegido con α -N-carbamoló y un aminoácido unido a la cadena de péptidos en crecimiento en una resina a temperatura ambiente en un disolvente inerte como dimetilformamida, N-metilpirrolidinona o cloruro de metileno en presencia de agentes de acoplamiento como diciclohexilcarbodiimida y 1hidroxibenzotriazol en presencia de una base como diisopropiletilamina. El grupo protector de α -N-carbamoló se elimina de la resina de péptidos resultante usando un reactivo como ácido trifluoroacético o piperidina, y la reacción de acoplamiento se repite con el siguiente aminoácido protegido en N que se añadirá a la cadena de péptidos. Los grupos protectores en N son bien conocidos en la técnica, con t-butiloxicarbonilo (tBoc) y fluorenilmethoxicarbonilo (Fmoc) preferidos en la presente memoria descriptiva.

Los disolventes, derivados de aminoácidos y resina de 4-metilbenzohidril-amina usados en el sintetizador de péptidos se adquieren en Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA), salvo que se indique lo contrario. Los aminoácidos protegidos de cadena lateral se adquieren en Applied Biosystems, Inc. e incluyen los siguientes: Boc-Arg (Mts), Fmoc-Arg(Pmc), Boc-Tr(Bzl), Fmoc-Tr(t-Bu), Boc-Ser(Bzl), Fmoc-Ser(t-Bu), Boc-Tir(BrZ), Fmoc-Tyr(t-Bu), Boc-Lys(CIZ), Fmoc-Lys(Boc), Boc-Glu(Bzl), Fmoc-Glu(t-Bu), Fmoc-His (Trt), Fmoc-Asn(Trt) y Fmoc-Gln(Trt). Boc-His (BOM) se adquiere en Applied Biosystems, Inc. o Bachem Inc. (Torrance, CA). Anisol, metilsulfuro, fenol, etanoditiol y tioanisol se obtienen en Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI). Air Products and Chemicals (Allentown, PA) suministra HF. El éter etílico, el ácido acético y el metanol se adquieren en Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

La síntesis de péptidos en fase sólida se efectúa con un sintetizador de péptidos automático (Modelo 430A, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) usando el sistema NMP/HOBt (opción 1) y la química Tboc o Fmoc (véase Manual de Usuario de Applied Biosystems para el Sintetizador de Péptidos ABI 430A, Versión 1.3B 1 de julio de 1988, sección 6, pág. 4970, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) con remate. Las resinas de péptidos Boc se escinden con HF (-5°C a 0°C, 1 hora). El péptido se extrae de la resina alternando agua y ácido acético, y los filtros se liofilizan. Las resinas de péptidos Fmoc se escinden según procedimientos estándar (*Introduction to Cleavage Techniques*, Applied Biosystems, Inc., 1990, pág. 6-12). Algunos péptidos se ensamblan también usando un Advanced Chem Tech Synthesizer (Modelo MPS 350, Louisville, Kentucky). Los péptidos se purifican mediante RP-HPLC (preparatoria y analítica) usando un sistema Waters Delta Prep 3000. Se usa una columna preparatoria C4, C8 o C18 (10 μ , 2,2 \times 25 cm; Vydac, Hesperia, Calif.) para aislar los péptidos, y se determina la pureza usando una columna analítica C4, C8 o C18 (5 μ , 0,46 \times 25 cm; Vydac). Los disolventes (A = 0,1% TFA/agua y B = 0,1% TFA/CH₃CN) se suministran a la columna analítica a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min y a la columna preparatoria a 15 ml/min. Los análisis de aminoácidos se realizan en el sistema Waters Pico Tag y se procesan usando el programa Maxima. Los péptidos se hidrolizan por hidrólisis ácida en fase de vapor (115°C, 20-24 h). Los hidrolizados se derivan y analizan mediante procedimientos estándar (Cohen, S.A., Meys, M., y Tarrin, T.L. (1989), *The Pico Tag Method: A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis*, pág. 11-52, Millipore Corporation, Milford, Mass.). El análisis de bombardeo rápido de átomos se efectúa mediante M-Scan, Incorporated (West Chester, Pa.). El calibrado de masas se realiza usando yoduro de cesio o yoduro de cesio/glicerol. El análisis de ionización por desorción de plasma mediante el uso de detección del tiempo de vuelo se efectúa en un espectrómetro de masas Bio-Ion 20 de Applied Biosystems.

Los compuestos de péptidos útiles en los procedimientos reivindicados también pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante, usando procedimientos conocidos actualmente en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor (1989).

Los compuestos referidos anteriormente forman sales con varios ácidos inorgánicos y orgánicos y bases. Dichas sales incluyen las preparadas con ácidos orgánicos e inorgánicos, por ejemplo, HCl, HBr, H₂SO₄, H₃PO₄, ácido trifluoroacético, ácido acético, ácido fórmico, ácido metanosulfónico, ácido toluensulfónico, ácido maleico, ácido fumárico y ácido alcanforsulfónico. 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 sales de acetato, clorhidrato y trifluoroacetato. Las sales pueden formarse por medios convencionales, por ejemplo, por reacción formas del ácido libre o base del producto con uno o más equivalentes de la base o ácido apropiado en un disolvente o medio en el que la sal es insoluble, o en un disolvente como agua que a continuación se retira al vacío o por congelación en seco o por intercambio de los iones de una sal existente por otro ion en una resina adecuada de intercambio iónico.

También se describen en la presente memoria descriptiva composiciones, que pueden proporcionarse convenientemente en la forma de formulaciones adecuadas para administración parenteral (incluyendo intravenosa, intramuscular y subcutánea) o nasal o transdérmica, y/o encapsuladas de forma adecuada o preparadas de otro modo por otros procedimientos conocidos para administración oral. El formato de administración adecuado puede ser determinado de forma óptima por un profesional médico para cada paciente individualmente. Los vehículos farmacéuticamente aceptables y su formulación se describen en tratados estándar 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 nº 10, Sup. 42:2S (1988). También se describen en la presente memoria descriptiva compuestos que pueden proporcionarse como composiciones parenterales para inyección o infusión. Preferentemente, se describen en un vehículo acuoso, por ejemplo, en una solución tampón isotónica a un pH de aproximadamente 4,3 a 7,4. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas convencionales de esterilización, o pueden filtrarse estériles. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiere para estabilizar la formulación, como agentes de forma-

ES 2 302 353 T3

ción de tampón de pH. Los tampones útiles incluyen, por ejemplo, tampones de acetato de sodio/ácido acético. Puede usarse una forma de preparado de liberación lenta en repositorio o “depot” de manera que se suministren cantidades terapéuticamente eficaces del preparado en el torrente sanguíneo durante muchas horas o días después de la inyección o suministro transdérmico.

5 Preferentemente, estas formas de dosificación parenteral incluyen de aproximadamente el 0,01 al 0,5% p/v, respectivamente, de una amilina y/o un agonista de amilina en un sistema acuoso junto con aproximadamente del 0,02 al 0,5% p/v de un tampón de acetato, fosfato, citrato o glutamato para obtener un pH de la composición final de aproximadamente 3,0 a 6,0 (más preferentemente de 3,0 a 5,5), así como aproximadamente del 1,0 al 10% p/v de un tonificador de carbohidrato o alcohol polihídrico en una fase continua acuosa. En la formulación preferida del producto también

10 está presente aproximadamente del 0,005 al 1,0% p/v de un conservante antimicrobiano seleccionado entre el grupo que consiste en m-cresol, alcohol bencílico, parabenos de metilo, etilo, propilo y butilo y fenol diseñados para permitir al paciente retirar dosis múltiples. En esta formulación no se requiere un estabilizador. Se usa una cantidad suficiente de agua para inyección para obtener la concentración deseada de solución. También puede estar presente cloruro de

15 sodio, así como otros excipientes, si se desea. Dichos excipientes, sin embargo, deben mantener la estabilidad global de la amilina, o un agonista de amilina. La formulación líquida debe ser isotónica. Con la máxima preferencia, en la formulación de amilina y/o agonista de amilina para administración parenteral, el alcohol polihídrico es manitol, el tampón es un tampón de acetato, el conservante es aproximadamente del 0,1 al 0,3% p/v de m-cresol, y el pH es

20 aproximadamente de 3,7 a 4,3.

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

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

30 Las composiciones desveladas en la presente memoria descriptiva que se administran según la presente invención por una ruta seleccionada a partir del grupo que consiste en administración subcutánea, intravenosa, nasal, oral, pulmonar, transdérmica y bucal, se preparan mezclando los ingredientes siguiendo procedimientos aceptados generalmente. 35 Por ejemplo, los componentes seleccionados pueden mezclarse simplemente en una mezcladora u otro dispositivo estándar para producir una mezcla concentrada que a continuación puede ajustarse a la concentración y viscosidad finales por la adición de agua o agente espesante y posiblemente un tampón para controlar el pH o un soluto adicional para controlar la tonicidad.

40 Para su uso por el médico, las composiciones se proporcionarán en forma de unidad de dosificación que contiene una cantidad de una amilina o agonista de amilina, por ejemplo, un agonista de amilina con un NSAID que será efectivo en una o múltiples dosis para controlar el dolor, la inflamación, la temperatura corporal, la coagulabilidad de la sangre u otra respuesta biológica objetivo en el nivel seleccionado. Las cantidades terapéuticamente eficaces de una amilina o agonista de amilina son aquellas que aliviarán el síntoma objetivo, o que conseguirán el nivel deseado de control. Como reconocerán los expertos en la materia, una cantidad eficaz de agente terapéutico variará con muchos factores que incluyen la edad y el peso del paciente, la condición física del paciente, la acción que se quiere obtener y otros factores.

45 La dosis diaria terapéuticamente eficaz de amilina o agonista de amilina, para el tratamiento de gastritis y úlceras que incluye h-amilina, ¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, ¹⁸Arg^{25,28,29}Pro-h-amilina, des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28,29}Pro-h-amilina, ^{25,28,29}Pro-h-amilina, des-¹Lys^{25,28,29}Pro-h-amilina y ²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina, estará normalmente en el intervalo de 0,01 µg/kg/día a aproximadamente 10 µg/kg/día, preferentemente entre aproximadamente 0,05 µg/kg/día y aproximadamente 6,0 µg/kg/día, más preferentemente entre aproximadamente 1-6 µg/kg/día y más preferentemente todavía entre aproximadamente 0,5 µg/kg/día a aproximadamente 4,0 µg/kg/día administrado en dosis únicas o divididas.

55 La dosis diaria eficaz de amilina o agonista amilina en combinación con un NSAID que incluye h-amilina, ¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, ¹⁸Arg^{25,28,29}Pro-h-amilina, des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28,29}Pro-h-amilina, ^{25,28,29}Pro-h-amilina, des-¹Lys^{25,28,29}Pro-h-amilina y ²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina, estará normalmente en el intervalo de 0,01 µg/kg/día a aproximadamente 10 µg/kg/día, preferentemente entre aproximadamente 0,05 µg/kg/día y aproximadamente 6,0 µg/kg/día, más preferentemente entre aproximadamente 1 y 6 µg/kg/día y más preferentemente todavía entre aproximadamente 0,5 µg/kg/día a aproximadamente 4,0 µg/kg/día administrado en dosis únicas o divididas. Para estas indicaciones, la dosis diaria eficaz del NSAID dependería del agente usado, y es comparable con las dosis cuando se usan NSAID en solitario. Por ejemplo, las dosis diarias para salicilato (aspirina) son de 150 mg a 3,5 g al día, para fenilbutazona de 100 mg a 600 mg al día, para indometacina de 50 mg a 200 mg al día y para acetaminofeno de 3 g a 6 g al día.

La dosis diaria eficaz de amilina o agonista de amilina para reducir los efectos gástricos adversos de la administración de un NSAID, que incluye h-amilina, ¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina, ¹⁸Arg^{25,28,29}Pro-h-amilina, des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28,29}Pro-h-amilina, ^{25,28,29}Pro-h-amilina, des-¹Lys^{25,28,29}Pro-h-amilina y ²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina, estará normalmente en el intervalo de 0,01 μ g/kg/día a aproximadamente 10 μ g/kg/día, preferentemente entre 5 aproximadamente 0,05 μ g/kg/día y aproximadamente 6,0 μ g/kg/día, más preferentemente entre aproximadamente 1-6 μ g/kg/día y más preferentemente todavía entre aproximadamente 0,5 μ g/kg/día y aproximadamente 4,0 μ g/kg/día administrado en dosis únicas o divididas. Para estas indicaciones, la dosis diaria eficaz del NSAID dependería del agente usado, y es comparable a las dosis cuando se usan NSAID en solitario. Por ejemplo, las dosis diarias para salicilato (aspirina) son de 150 mg a 3,5 g al día, para fenilbutazona de 100 mg a 600 mg al día, para indometacina de 50 mg a 10 200 mg al día y para acetaminofeno de 3 g a 6 g al día.

La dosis exacta que se administrará para cada indicación es determinada por el médico especialista y depende del lugar en que el compuesto particular se encuentre dentro del intervalo mencionado anteriormente, así como de la edad, peso y condición del individuo. Los expertos en la materia reconocerán que pueden administrarse también otras 15 dosis no diarias. La administración debe iniciarse al primer signo de síntomas en el caso de gastritis o úlceras o en el momento en que se determine que el sujeto debe iniciar una terapia con NSAID. La administración es preferentemente por inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular. La administración puede ser también nasal, transdérmica o bucal. Los compuestos oralmente activos pueden tomarse oralmente, sin embargo las dosificaciones deben ajustarse basándose en su potencia y biodisponibilidad, según resulte apropiado.

20 Los siguientes Ejemplos son ilustrativos, pero no limitativos de los procedimientos de la presente invención. Otras amilinas y agonistas de amilina adecuados que pueden adaptarse para su uso en los procedimientos reivindicados son también apropiados y están dentro del espíritu y el ámbito de la invención.

25 **Ejemplo 1**

Propiedades gastroprotectoras de la amilina

30 En este ejemplo se describen las propiedades gastroprotectoras de la amilina en un modelo animal para gastritis: una rata alimentada por sonda con etanol.

Se examinó el efecto de la amilina en la inducción de daño experimental en la mucosa en ratas por alimentación 35 por sonda de 1 ml etanol absoluto. El daño en la mucosa se valoró entre 0 (ausencia de daño) y 5 (100% de estómago cubierto por hiperemia y úlceras) por investigadores a ciegas en el tratamiento. Se inyectó amilina en ratas en suero 40 salino por vía subcutánea en ratas macho Harlan-Sprague-Dawley conscientes en ayunas en dosis de 0, 0,001, 0,01, 0,1, 0,3, 1, 3 o 10 μ g (n = 12, 5, 5, 9, 9, 5, 6 respectivamente) 5 min antes de alimentación por sonda. El daño en la mucosa, calculado como porcentaje de valoraciones en controles tratados con suero salino, fue, con las anteriores 45 dosis subcutáneas en aumento, respectivamente de: 100,0 \pm 8,3%, 95,3 \pm 15,2%, 76,6 \pm 13,8%, 70,1 \pm 10,7%*, 33,9 \pm 7,7%**, 59,6 \pm 5,8%**, 35,6 \pm 11,5%**, 32,9 \pm 8,3%** (*P < 0,05, ** P < 0,001 frente a control con suero salino). Es decir, la amilina redujo la valoración de lesión en hasta el 67%, según se observó con dosis de 10 μ g. La DE₅₀ para el efecto gastroprotector de la amilina en este sistema experimental fue de 0,036 μ g/rata \pm 0,4 unidades logarítmicas. Se predijo la dosis gastroprotectora al 50% de amilina en ratas (0,036 μ g/rata) para aumentar las 50 concentraciones circulantes de amilina en 1,8 \pm 0,4 pM. Esta predicción se obtuvo aplicando la relación publicada entre dosis subcutánea inyectada y concentración máxima de plasma en ratas. Young, A.A. y col., *Drug Devel. Res.* 37:231-48 (1996). Un cambio en la concentración en plasma de amilina de 1,8 pM está dentro del intervalo de fluctuaciones que se comunica que ocurren en roedores normales, lo que indica que es probable que la amilina circulante endógena ejerza un efecto gastroprotector tónico. Es improbable que la emulación de este efecto fisiológico dé como resultado efectos secundarios no deseados, como es a menudo el caso en administración de xenobióticos no fisiológicos. La ausencia de efectos secundarios potencia la utilidad de agonistas de amilina usados para los fines y de la manera especificada en la presente memoria descriptiva.

55 **Ejemplo 2**

Preparación de ^{25,28,29}Pro-h-amilina

Se efectuó la síntesis en fase sólida de ^{25,28,29}Pro-h-amilina usando resina de unión anclada a metilbenzimidazolamina y protección de cadena lateral de N^a-Boc/bencilo mediante procedimientos estándar de síntesis de péptidos. La ²⁷-[disulfuro]amilin-MBHA-resina se obtuvo por tratamiento de cisteínas protegidas Acm con trifluoroacetato de talio (III) en ácido trifluoroacético. Después de ciclación se consiguió la resina y los grupos protectores de cadena lateral se escindieron con HF líquido en presencia de dimetilsulfuro y anisol. La ^{25,28,29}Pro-h-amilina se purificó mediante HPLC preparatoria de fase inversa. Se encontró que el péptido era homogéneo mediante HPLC analítica y electroforesis capilar y la estructura se confirmó mediante análisis de aminoácidos y análisis de secuencias. El producto dio el ion 65 de masa deseada. Espec. masas FAB: (M+H)⁺ = 3,949.

Ejemplo 3

Preparación de $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-amilina}$

5 Se realizó la síntesis de fase sólida de $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-amilina}$ usando resina de unión anclada a metilbenzhidrilamina y protección de cadena lateral de N^a-Boc/bencilo mediante procedimientos estándar de síntesis de péptidos. La 2,7-[disulfuro]amilin-MBHA-resina se obtuvo por tratamiento de cisteínas protegidas Acm con trifluoroacetato de talio (III) en ácido trifluoroacético. Después de ciclación se consiguió la resina y los grupos protectores de cadena lateral se escindieron con HF líquido en presencia de dimetilsulfuro y anisol. La $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-amilina}$ se purificó 10 por HPLC preparatoria de fase inversa. Se encontró que el péptido era homogéneo por HPLC analítica y electroforesis capilar y la estructura se confirmó por análisis de aminoácidos y análisis de secuencias. El producto dio el ion de masa deseada. Espec. masas FAB: (M+H)⁺ = 3,971.

15 Ejemplo 4

Preparación de $^{18}\text{Arg}^{25,28}\text{Pro-h-amilina}$

20 Se realizó la síntesis de fase sólida de $^{18}\text{Arg}^{25,28}\text{Pro-h-amilina}$ usando resina de unión anclada a metilbenzhidrilamina y protección de cadena lateral de N^a-Boc/bencilo mediante procedimientos estándar de síntesis de péptidos. La 2,7-[disulfuro]amilin-MBHA-resina se obtuvo por tratamiento de cisteínas protegidas Acm con trifluoroacetato de talio (III) en ácido trifluoroacético. Después de ciclación se consiguió la resina y los grupos protectores de cadena lateral se escindieron con HF líquido en presencia de dimetilsulfuro y anisol. La $^{18}\text{Arg}^{25,28}\text{Pro-h-amilina}$ se purificó 25 por HPLC preparatoria de fase inversa. Se encontró que el péptido era homogéneo por HPLC analítica y electroforesis capilar y la estructura se confirmó por análisis de aminoácidos y análisis de secuencias. El producto dio el ion de masa deseada. Espec. masas FAB: (M+H)⁺ = 3,959.

Ejemplo 5

30 *Ensayo de unión a receptor*

La evaluación de la unión de compuestos a receptores de amilina se efectuó del modo siguiente. Se adquirió ^{125}I -amilina de ratas (Bolton-Hunter marcado en lisina N-terminal) en Amersham Corporation (Arlington Heights, IL). 35 Las actividades específicas en el momento del uso estuvieron entre 1.950 y 2.000 Ci/mmol. Los péptidos no marcados se obtuvieron de BACHEM Inc. (Torrance, CA) y Peninsula Laboratories (Belmont, CA).

40 Se sacrificaron por decapitación ratas Sprague-Dawley macho (200-250) gramos. Se extrajeron los encéfalos en suero salino con tampón de fosfato (PBS) en frío. A partir de la superficie ventral, se realizaron cortes rostrales con el hipotálamo, unidos lateralmente por los tractos olfativos y que se extendían en un ángulo de 45° medialmente desde estos tractos. Este tejido de prosencéfalo basal, que contenía el nucleus accumbens y las regiones circundantes, se pesó y se homogeneizó en tampón HEPES 20 mM enfriado en hielo (ácido HEPES 20 mM, pH ajustado a 7,4 con NaOH a 23°C). Se lavaron las membranas tres veces en tampón nuevo por centrifugado durante 15 minutos a 48.000 x g. La granza de membrana final se volvió a suspender en tampón HEPES 20 mM que contenía fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,2 mM.

45 Para medir la unión a ^{125}I -amilina, se incubaron membranas de 4 mg de peso en húmedo original de tejido con ^{125}I -amilina a 12-16 pM en tampón HEPES 20 mM que contenía 0,5 mg/ml de bacitracina, 0,5 mg/ml de albúmina de suero bovino y 0,2 mM de PMSF. Se incubaron soluciones durante 60 minutos a 23°C. Las incubaciones se terminaron por 50 filtrado a través de filtros de fibra de vidrio GF/B (Whatman Inc., Clifton, NJ) que se habían prehumedecido durante 4 horas en polietilenimina al 0,3% con el fin de reducir la unión no específica de péptidos radiomarcados. Los filtros se lavaron inmediatamente antes de filtrado con 5 ml de PBS en frío, e inmediatamente después de filtrado con 15 ml de PBS en frío. Se retiraron los filtros y se evaluó la radioactividad en un contador gamma con una eficacia de recuento del 77%. Se generaron curvas de competencia midiendo la unión en presencia de 10^{-12} a 10^{-6} M de compuesto de prueba no marcado y se analizaron mediante regresión no lineal usando una ecuación logística de 4 parámetros (programa Inplot; GraphPAD Software, San Diego).

55 En este ensayo, la amilina humana purificada se une a su receptor a una Cl_{50} medida de aproximadamente 50 pM. Los resultados para compuestos de prueba se exponen en la Tabla I, que muestra que cada uno de los compuestos tiene actividad de unión a receptor significativa.

ES 2 302 353 T3

TABLA I

CE₅₀ (nM) Ensayo de unión a receptor CI₅₀ (pM)

5	1) ²⁸ Pro-h-Amilina 15,0
	2) ²⁵ Pro ²⁶ Val ^{28,29} Pro-h-Amilina 18,0
10	3) ^{2,7} Ciclo-[² Asp, ⁷ Lys]-h-Amilina 310,0
	4) ²⁻³⁷ h-Amilina 236,0
15	5) ¹ Ala-h-Amilina 148,0
	6) ¹ Ser-h-Amilina 33,0
	7) ²⁹ Pro-h-Amilina 64,0
20	8) ^{25,28} Pro-h-Amilina 26,0
	9) des- ¹ Lys ^{25,28} Pro-h-Amilina 85,0
25	10) ¹⁸ Arg ^{25,28} Pro-h-Amilina 32,0
	11) des- ¹ Lys ¹⁸ Arg ^{25,28} Pro-h-Amilina 82,0
30	12) ¹⁸ Arg ^{25,28,29} Pro-h-Amilina 21,0
	13) des- ¹ Lys ¹⁸ Arg ^{25,28,29} Pro-h-Amilina 21,0
	14) ^{25,28,29} Pro-h-Amilina 10,0
35	15) des- ¹ Lys ^{25,28,29} Pro-h-Amilina 14,0

Ejemplo 6

40 *Ensayo de vaciado gástrico de rojo de fenol*

El vaciado gástrico se midió usando una modificación (Plourde y col., *Life Sci.* 53:857-862 (1993)) del procedimiento original de Scarpignato y col. (*Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 246; 286-295 (1980)). Brevemente, las ratas conscientes recibieron por alimentación por sonda 1,5 mL de un gel sin color que contenía el 1,5% de metilcelulosa (M-0262, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y el 0,05% de indicador de rojo de fenol. Veinte minutos después de alimentación por sonda, se anestesió a las ratas usando halotano al 5%, se expuso el estómago y se pinzó en los esfínteres pilórico y esofágico inferior usando fórceps arteriales, se retiró y se abrió en una solución alcalina que se preparó hasta un volumen fijo. El contenido del estómago se dedujo a partir de la intensidad del rojo de fenol en la solución alcalina, medida por absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. En la mayoría de los experimentos, el estómago estaba limpio. En otros experimentos, se centrifugó el contenido gástrico en partículas para limpiar la solución para medidas de absorbancia. Cuando el contenido gástrico diluido permanecía turbio, la absorbancia espectroscópica debida a rojo de fenol se dedujo como la diferencia entre el diluyente presente en alcalino frente a acetificado. En experimentos separados en 7 ratas, se escindieron el estómago y el intestino delgado y se abrieron en una solución alcalina. La cantidad de rojo de fenol que podría recuperarse a partir del tracto gastrointestinal superior después de 29 minutos de alimentación por sonda fue del $89 \pm 4\%$; el tinte que aparecía para unirse irrecuperablemente a la superficie luminal del tracto puede haber contado para el equilibrio. Para compensar esta pequeña pérdida, el porcentaje de contenido del estómago que quedaba después de 20 minutos se expresó como una fracción del contenido gástrico recuperado de las ratas de control sacrificadas inmediatamente después de alimentación por sonda en el mismo experimento. Porcentaje de contenido de vaciado gástrico restante = (absorbancia a 20 min)/(absorbancia a 0 min). Las curvas de dosis-respuesta para vaciado gástrico se ajustaron a un modelo logístico de 4 parámetros usando una rutina iterativa de mínimos cuadrados (ALLFIT, v2.7, NIH, Bethesda, MD) para deducir los DE₅₀. Como el DE₅₀ tiene una distribución logarítmica normal, se expresa \pm error típico del logaritmo. Se realizaron comparaciones por pares usando análisis unidireccional de variancia y la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls (Instat v2.0, GraphPad Software, San Diego, CA) usando $P < 0,05$ como nivel de significación.

ES 2 302 353 T3

En estudios de dosis-respuesta, la amilina en ratas (Bachem, Torrance, CA) disuelta en suero salino 0,15 M se administró como un bolo subcutáneo de 0,1 mL en dosis de 0, 0,01, 0,1, 1, 10 ó 100 μ g 5 minutos antes de alimentación por sonda en ratas Harlan-Sprague-Dawley (no diabéticas) en ayunas 20 horas y ratas diabéticas BB en ayunas 6 horas. Cuando se administraron inyecciones subcutáneas de amilina 5 minutos antes de alimentación por sonda con 5 indicador de rojo de fenol, se produjo una supresión dependiente de la dosis de vaciado gástrico (datos no mostrados). La supresión de vaciado gástrico estuvo completa en ratas HSD normales con administración de 1 μ g de amilina, y en ratas diabéticas con administración de 10 μ g ($P = 0,22, 0,14$). El DE_{50} para inhibición de vaciado gástrico en ratas normales fue de 0,43 μ g (0,60 nmol/kg) \pm 0,19 unidades logarítmicas, y fue de 2,2 μ (2,3 nmol/kg) \pm 0,18 unidades logarítmicas en ratas diabéticas.

10

Ejemplo 7

Ensayo de vaciado gástrico de glucosa tritiada

15

Se sujetaron por la cola ratas Harlan-Sprague-Dawley conscientes no en ayunas, cuya punta se anestesió usando lidocaína al 2%. El tritio en plasma separado de la sangre de la cola recogida 0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de alimentación por sonda se detectó en un contador beta. Se inyectó a ratas por vía subcutánea con 0,1 mL de solución salina que contenía 0, 0,1, 0,3, 1, 10 ó 100 μ g de amilina en ratas 1 minuto antes de alimentación por sonda ($n = 8$, 7, 5, 5, 5, respectivamente). Después de alimentación por sonda de ratas preinyectadas con suero salino con glucosa 20 tritiada, el tritio en plasma aumentó rápidamente ($t_{1/2}$ de aproximadamente 8 minutos) a una asymptota que declinó rápidamente. La inyección subcutánea con amilina se ralentizó de forma dependiente de la dosis y/o se retrasó la absorción de la etiqueta. La actividad de tritio en plasma se integró durante 30 minutos para obtener las áreas bajo la curva representadas en función de dosis de amilina. El DE_{50} obtenido del ajuste logístico fue de 0,35 μ g de amilina.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de una amilina o un análogo de agonista de amilina seleccionado entre el grupo que consiste en:

5 i) Un análogo de agonista de amilina que tiene la secuencia de aminoácidos:

¹A₁-X-Asn-Thr-⁵Ala-Thr-Y-Ala-Thr-¹⁰Gln-Arg-Leu-B₁-Asn-¹⁵Phe-Leu-C₁-D₁-E₁-²⁰F₁-G₁-Asn-H₁-Gly-²⁵Pro-I₁-Leu-Pro-J₁-³⁰Thr-K₁-Val-Gly-Ser-³⁵Asn-Thr-Tyr-Z

10 en la que

A₁ es Lys, Ala, Ser o hidrógeno;

15 B₁ es Ala, Ser o Thr;

C₁ es Val, Leu o Ile;

D₁ es His o Arg;

20 E₁ es Ser o Thr;

F₁ es Ser, Thr, Gln o Asn;

25 G₁ es Asn, Gln o His;

H₁ es Phe, Leu o Tyr;

I₁ es Ile, Val, Ala o Leu;

30 J₁ es Ser, Pro o Thr;

K₁ es Asn, Asp o Gln;

35 X e Y son residuos seleccionados independientemente que tienen cadenas laterales que están químicamente enlazadas entre sí para formar una unión intramolecular, en los que dicha unión intramolecular comprende un enlace de disulfuro, una lactama o una unión de tioéster; y Z es amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquiloxy, ariloxi o aralquiloxy; y siempre que A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Val, J₁ es Pro y K₁ es Asn; entonces uno o más de A₁ a K₁ es un aminoácido D y Z se selecciona entre el grupo que consiste en alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquiloxy, ariloxi o aralquiloxy.

40 ii) Un análogo de agonista de amilina que tiene la secuencia de aminoácidos:

¹A₁-X-Asn-Thr-⁵Ala-Thr-Y-Ala-Thr-¹⁰Gln-Arg-Leu-B₁-Asn-¹⁵Phe-Leu-C₁-D₁-E₁-²⁰F₁-G₁-Asn-H₁-Gly-²⁵Pro-I₁-Leu-J₁-Pro-³⁰Thr-K₁-Val-Gly-Ser-³⁵Asn-Thr-Tyr-Z

45 en la que

A₁ es Lys, Ala, Ser o hidrógeno;

50 B₁ es Ala, Ser o Thr;

C₁ es Val, Leu o Ile;

D₁ es His o Arg;

E₁ es Ser o Thr;

55 F₁ es Ser, Thr, Gln o Asn;

G₁ es Asn, Gln o His;

H₁ es Phe, Leu o Tyr;

60 I₁ es Ile, Val, Ala o Leu;

J₁ es Ser, Pro, Leu, Ile o Thr;

ES 2 302 353 T3

K₁ es Asn, Asp o Gln;

X e Y son residuos seleccionados independientemente que tienen cadenas laterales que están químicamente enlazadas entre sí para formar una unión intramolecular, en los que dicha unión intramolecular comprende un enlace de disulfuro, una lactama o una unión de tioéter; y Z es amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquiloxy, ariloxi o aralquiloxy; y siempre que

5 (a) A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Val, J₁ es Pro y K₁ es Asn; o

10 (b) A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es His, E₁ es Ser, F₁ es Asn, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Val, J₁ es Ser y K₁ es Asn;

15 entonces uno o más de A₁ a K₁ es un aminoácido D y Z se selecciona entre el grupo que consiste en alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquiloxy, ariloxi o aralquiloxy.

iii) Un análogo de agonista de amilina que tiene la secuencia de aminoácidos:

20 ¹A₁-X-Asn-Thr-⁵Ala-Thr-Y-Ala-Thr-¹⁰Gln-Arg-Leu-B₁-Asn-¹⁵Phe-Leu-C₁-D₁-E₁-²⁰F₁-G₁-Asn-H₁-Gly-²⁵I₁-J₁-Leu-Pro-Pro-³⁰Thr-K₁-Val-Gly-Ser-³⁵Asn-Thr-Tyr-Z

en la que

25 A₁ es Lys, Ala, Ser o hidrógeno;

B₁ es Ala, Ser o Thr;

C₁ es Val, Leu o Ile;

30 D₁ es His o Arg;

E₁ es Ser o Thr;

F₁ es Ser, Thr, Gln o Asn;

35 G₁ es Asn, Gln o His;

H₁ es Phe, Leu o Tyr;

40 I₁ es Ala o Pro;

J₁ es Ile, Val, Ala o Leu;

K₁ es Asn, Asp o Gln;

45 X e Y son residuos seleccionados independientemente que tienen cadenas laterales que están químicamente enlazadas entre sí para formar una unión intramolecular, en los que dicha unión intramolecular comprende un enlace de disulfuro, una lactama o una unión de tioéter; y Z es amino, alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquiloxy, ariloxi o aralquiloxy; y siempre que A₁ es Lys, B₁ es Ala, C₁ es Val, D₁ es Arg, E₁ es Ser, F₁ es Ser, G₁ es Asn, H₁ es Leu, I₁ es Pro, J₁ es Val y K₁ es Asn; entonces uno o más de A₁ a K₁ es un aminoácido D y Z se selecciona entre el grupo que consiste en alquilamino, dialquilamino, cicloalquilamino, arilamino, aralquilamino, alquiloxy, ariloxi o aralquiloxy.

55 o del grupo que consiste en

Arg^{25,28}Pro-h-amilina,

des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amilina,

60 Arg^{25-28,29}Pro-h-amilina,

des-¹Lys¹⁸Arg^{25,28,29}Pro-h-amilina,

^{25,28-29}Pro-h-amilina,

65 des-¹Lys^{25,28,29}Pro-h-amilina,

Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina,

ES 2 302 353 T3

²³Leu²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina,

²³Leu²⁵Pro²⁶Val²⁸Pro-h-amilina,

5 des-¹Lys²³Leu²⁵Pro²⁶Val²⁸Pro-h-amilina,

¹⁸Arg²³Leu²⁵Pro²⁶Val²⁸Pro-h-amilina,

10 ¹⁸Arg²³Leu^{25,28,29}Pro-h-amilina,

¹⁸Arg²³Leu^{25,28}Pro-h-amilina,

¹⁷Ile²³Leu^{25,28,29}Pro-h-amilina,

15 ¹⁷Ile^{25,28,29}Pro-h-amilina,

des-¹Lys¹⁷Ile²³Leu^{25,28,29}Pro-h-amilina,

¹⁷Ile¹⁸Arg²³Leu-h-amilina,

20 ¹⁷Ile¹⁸Arg²³Leu²⁶Val²⁹Pro-h-amilina,

¹⁷Ile¹⁸Arg²³Leu²⁵Pro²⁶Val^{28,29}Pro-h-amilina,

25 ¹³Thr²¹His²³Leu²⁶Ala²⁸Leu²⁹Pro³¹Asp-h-amilina,

¹³Thr²¹His²³Leu²⁶Ala²⁹Pro³¹Asp-h-amilina,

30 des-¹Lys¹³Thr²¹His²³Leu²⁶Ala²⁸Pro³¹Asp-h-amilina,

¹³Thr¹⁸Arg²¹His²³Leu²⁶Ala²⁹Pro³¹Asp-h-amilina,

¹³Thr¹⁸Arg²¹His²³Leu^{28,29}Pro³¹Asp-h-amilina, y

35 ¹³Thr¹⁸Arg²¹His²³Leu²⁵Pro²⁶Ala^{28,29}Pro³¹Asp-h-amilina

para preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir la gastritis o úlcera gástrica en un sujeto, comprendiendo dicha composición farmacéutica dicha amilina o dicho análogo de agonista de amilina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en un vehículo y dosis farmacéuticamente aceptables, en el que dicha composición se administra por una ruta seleccionada entre el grupo que consiste en administración subcutánea, intravenosa, nasal, oral, pulmonar, transdérmica y bucal.

40 2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicha composición comprende un tampón o un conservante o un agente espesante.

45 3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha composición farmacéutica se usará en conjunción con un agente antiinflamatorio no esteroideo.

50 4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho sujeto es humano.

55 5. El uso según la reivindicación 1 en el que dicho análogo de agonista de amilina es ^{25,28,29}Pro-h-amilina.

60 6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha gastritis está inducida por la administración de un agente antiinflamatorio no esteroideo.

65 7. El uso según las reivindicaciones 3 ó 6, en el que dicho agente antiinflamatorio no esteroideo se selecciona entre el grupo que consiste en salicilato, fenilbutazona, indometacina, acetaminofeno, fenacetina, naproxeno, ibuprofeno, sulandac, etodolac, fenamatos, telmetina, cеторалак, diclofenac, fenoprofeno, cetoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina, piroxicam y apazona.

8. Uso según las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho sujeto sufre efectos gástricos inducidos por agente antiinflamatorio no esteroideo seleccionados entre el grupo que consiste en gastritis erosiva aguda, úlceras gástricas o intestinales, molestias epigástricas, náuseas, vómitos y hemorragia.

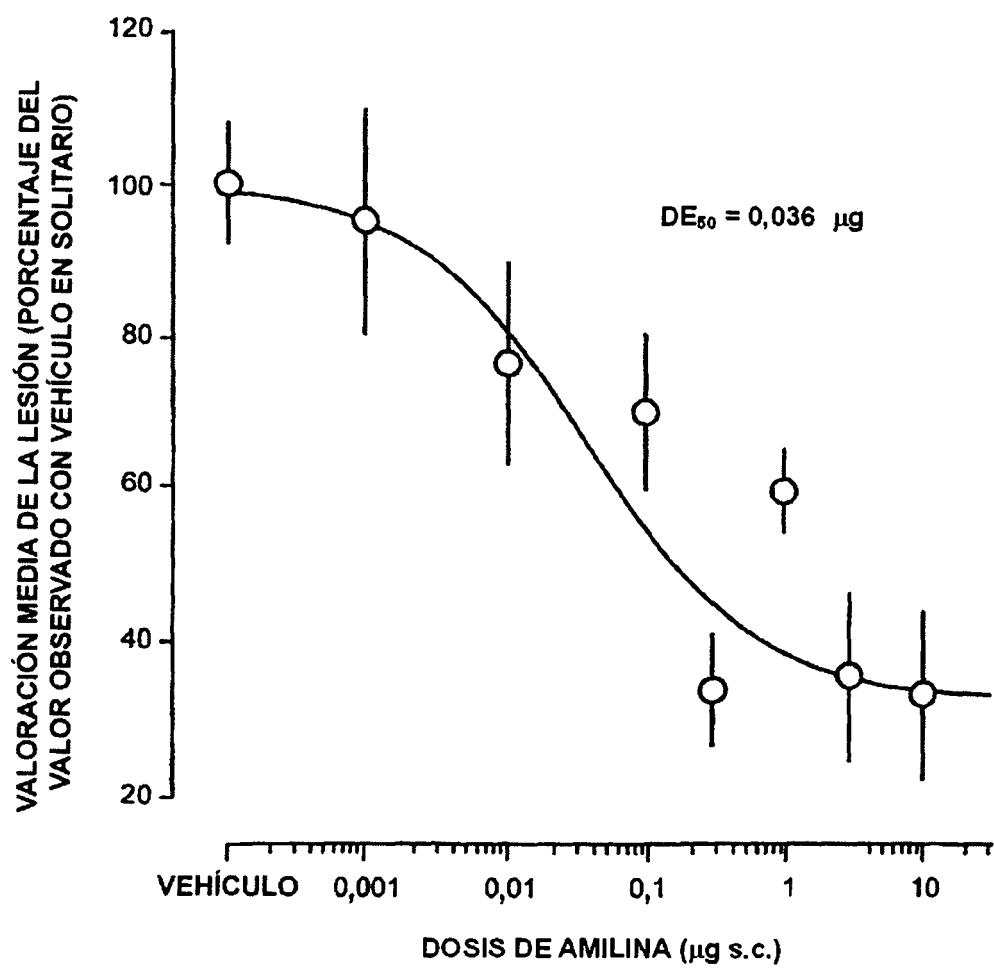


Fig. 1