



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 072**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/22** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**A61P 5/48** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 14/575** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06002683 .8**

96 Fecha de presentación : **14.01.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1658856**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2006**

54 Título: **Exendina para la supresión del glucagón.**

30 Prioridad: **14.01.1999 US 116380 P**  
**30.04.1999 US 132017 P**  
**10.01.2000 US 175365 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.07.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.07.2010**

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

72 Inventor/es: **Young, Andrew y**  
**Gedulin, Bronislava**

74 Agente: **Manresa Val, Manuel**

ES 2 343 072 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

Exendina para la supresión del glucagón.

5 Procedimientos para inhibir el glucagón.

**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a un compuesto para utilizar en la inhibición y/o la disminución del glucagón en un paciente, siendo dicho compuesto una exendina especificada, un agonista de la exendina, una exendina modificada o un agonista modificado de la exendina. Dichos compuestos resultan útiles, por ejemplo, en el tratamiento de la hiperglucagonemia y otros cuadros clínicos en los que la disminución de los niveles de glucagón o la inhibición del glucagón resultan beneficiosos.

15 **Antecedentes**

La siguiente descripción comprende información que puede resultar útil para la comprensión de la presente invención. No significa la admisión de que cualquiera de las informaciones proporcionadas aquí son técnicas anteriores a la presente invención, o pertinentes, ni de que cualquiera las publicaciones a las que se hace referencia específicamente o implícitamente son técnicas anteriores.

20 Las exendinas son péptidos que se encuentran en las secreciones salivales del monstruo de Gila y el monstruo verde mejicano, reptiles autóctonos de Arizona y del norte de México. La exendina-3 [SEC. ID. n.º 1: His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Ser-NH<sub>2</sub>] se encuentra en las secreciones salivares del *Heloderma horridum* (monstruo verde mejicano), y la exendina-4 [SEC. ID. n.º 2: His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Ser-NH<sub>2</sub>] se encuentra en las secreciones salivares del *Heloderma suspectum* (monstruo de Gila) (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 la exendina-3 se ilustra en la Figura 1. La secuencia de aminoácidos de la exendina-4 se ilustra en la Figura 2. En un principio se creyó que la exendina-4 era un componente (potencialmente tóxico) del veneno. Hoy en día se sabe que carece de toxicidad y que en cambio se produce en las glándulas salivares del monstruo de Gila.

35 Las exendinas presentan una cierta similitud en la secuencia con varios miembros de la familia de los péptidos análogos al glucagón, siendo el mayor grado de homología, un 53%, con el GLP-1 [7 - 36] NH<sub>2</sub> [SEC ID n.º 3] (Goke, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268: 19650 - 55, 1993). El GLP-1[7 - 36] NH<sub>2</sub>, al que se hace referencia también como proglucagón [78 - 107], o simplemente "GLP-1", el término que se va a emplear habitualmente en la presente memoria, realiza un efecto insulínico, estimulando la secreción de insulina de las células  $\beta$  del páncreas; también se ha publicado que el GLP-1 inhibe la secreción de glucagón de las células  $\alpha$  del páncreas (Ørsov, *et al.*, *Diabetes*, 42: 658 - 61, 1993; D'Alessio, *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 97: 133 - 38, 1996). Se ha publicado 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 del ácido gástrico (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 presenta un residuo de glicina adicional en el extremo carboxílico, también estimula la secreción de insulina en pacientes humanos (Ørsov, *et al.*, *Diabetes*, 42: 658 - 61, 1993). Se ha publicado que una proteína G transmembrana receptora de la adenilato-ciclasa que se considera la responsable, al menos en parte, del efecto insulínico del GLP-1 se ha clonado a partir de una estirpe de células  $\beta$  (Thorens, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 89:8641 - 45, 1992). Una parte importante de la investigación en los últimos años se ha centrado en el GLP-1 debido a las publicaciones sobre su acción en la amplificación de la producción de insulina estimulada (Byrne MM, Goke B. *Lessons from human studies with glucagon-like peptide-1: Potential of the gut hormone for clinical use* ["Lecciones de estudios en humanos con el péptido-1 análogo al glucagón: potencial de la hormona digestivo para uso clínico"]. En: Fehmann HC, Goke B. *Insulinotropic Gut Hormone Glucagon-Like Peptide 1*. Basel, Switzerland: Karger, 1997: 219 - 33).

55 Otras publicaciones se refieren a la inhibición del vaciado gástrico (Wettergren A, *et al.*, *Truncated GLP-1 (proglucagon 78 - 107 - amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man* ["El GLP-1 truncado (proglucagón 78 - 107 amida) inhibe las funciones pancreáticas y gástricas del ser humano"], *Dis. Dis. Sci.* 1993 Abril; 38(4): 665 - 73), la inhibición de la secreción de glucagón (Creutzfeldt WOC, *et al.*, *Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I (7 - 36) amide in type I diabetic patients* ["Acciones glucagonostáticas y reducción de la hiperglucemia en ayunas mediante un péptido I amida (7 - 36) exogénico análogo al glucagón en diabéticos de tipo 1"], *Diabetes Care* 1996; 19(6): 580 - 6), y una supuesta función en el control del apetito (Turton MD, *et al.*, *A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding* ["La función del péptido-1 análogo al glucagón en la regulación central de la alimentación"], *Nature* 1996 Enero; 379 (6560): 69 - 72).

65 Se ha publicado que el GPL-1 también restablece la sensibilidad a la glucosa de los islotes en ratas viejas, recuperando su tolerancia a la glucosa hasta un nivel propio de ratas más jóvenes (Egan JM, *et al.*, *Glucagon-like peptide-1 restores acute-phase insulin release to aged rats* ["El péptido-1 análogo al glucagón restablece la liberación de insulina en la fase aguda en ratas viejas"], *Diabetologia* 1997 Junio; 40 (Suppl 1):A130). Sin embargo, la corta duración de la acción biológica del GLP-1 *in vivo* es una de las características del péptido que ha dificultado su desarrollo como

agente terapéutico. Se han probado diversos procedimientos para prolongar la vida media del GLP-1 o el GLP-1 (7 - 37), comprendiendo intentos de alterar su secuencia de aminoácidos y de administrarlos utilizándose determinadas formulaciones (véase por ejemplo, la solicitud de patente europea titulada “*Prolonged Delivery of Peptides*” [“Administración prolongada de péptidos”], de Darey, *et al.*, publicación número 0 619 322 A2, contemplando la inclusión de macrogol en las formulaciones que comprenden GLP-1 (7 - 37)).

Las investigaciones farmacológicas han demostrado que la exendina-4 puede actuar en los receptores del GLP-1 de determinadas células secretoras de insulina, en las células acinares dispersas del páncreas de conejillos de Indias, y en las células parietales del estómago; también se ha publicado que el péptido estimula la liberación de la somatostatina e inhibe la liberación de la 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). Se descubrió que la exendina-3 y la exendina-4 estimulaban la producción de AMPc en las células acinares pancreáticas y la liberación de la amilasa de las mismas (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). Además, la exendina-4 presenta una duración significativamente superior en su acción que el GLP-1. Por ejemplo, se publicó en un experimento que el descenso en el nivel de glucosa por parte de la exendina-4 en ratones diabéticos persistía durante varias horas y, en función de la dosis, hasta 24 horas (Eng J. *Prolonged effect of exendin-4 on hyperglycemia of db/db mice* [“Efectos prolongados de la exendina-4 en la hiperglucemia de ratones db/db”], *Diabetes* 1996 Mayo; 45 (Suppl 2): 152A (sumario 554)). Basándose en sus actividades insulino-trópicas, se ha propuesto el uso de la exendina-3 y de la exendina-4 en el tratamiento de la diabetes mellitus y en la prevención de la hiperglucemia (Eng, patente US n.º 5.424.286).

Los resultados de una investigación sobre si las exendinas son las especies homólogas del GLP-1 de los mamíferos los publicaron Chen y Drucker clonando el gen de la exendina del monstruo de Gila (*J. Biol. Chem.* 272 (7): 4108 - 15 (1997)). La observación que el monstruo de Gila también presenta genes separados para los proglucagones (a partir de los que se procesa el GLP-1), que son más similares al proglucagón de los mamíferos que la exendina, indica que las exendinas no son las especies homólogas del GLP-1.

Hasta la fecha, los agentes que sirven para retardar el vaciado gástrico han encontrado generalmente su lugar en la medicina como herramienta de diagnóstico en las exploraciones radiológicas gastrointestinales. Por ejemplo, el glucagón es una hormona polipeptídica que se produce en las células  $\alpha$  de los islotes pancreáticos de Langerhans. Es un agente hiperglucémico que moviliza la glucosa al activar la gluconeogénesis hepática. En un menor grado puede estimular la secreción de la insulina pancreática. El glucagón se utiliza en el tratamiento de la hipoglucemia provocada por la insulina, por ejemplo, cuando no resulta posible la administración de glucosa por vía intravenosa. Sin embargo, debido a que el glucagón reduce la motilidad del tracto gastrointestinal también se emplea como herramienta de diagnóstico en las exploraciones radiológicas gastrointestinales. El glucagón también se ha empleado en varias investigaciones para tratar diversos trastornos gastrointestinales dolorosos relacionados con los espasmos. Daniel *et al.* (*Br. Med. J.*, 3: 720, 1974) publicaron que se producía un alivio sintomático de la más rápido de la diverticulitis aguda en pacientes tratados con glucagón en comparación con los que se habían tratado con analgésicos o antiespasmódicos. En una publicación de Glauser, *et al.* (*J. Am. Coll. Emergency Physns*, 8: 228, 1979) se describe la liberación de una obstrucción alimenticia aguda en el esófago tras el tratamiento con glucagón. En otro estudio, el glucagón alivió de manera significativa el dolor en 21 pacientes enfermos de las vías biliares en comparación con los 22 pacientes tratados con un placebo (M. J. Stower, *et al.*, *Br. J. Surq.*, 69: 591 - 2, 1982).

Los procedimientos de regulación de la motilidad gastrointestinal empleando agonistas de la amilina se describen en el documento WO 95/07098.

Los procedimientos de regulación de la motilidad gastrointestinal empleando agonistas de la exendina se describe en la solicitud de patente US n.º 08/908-867.

Los procedimientos para reducir la ingesta alimenticia empleando agonistas de la exendina se describen en la solicitud de patente US 09/003.869.

Se describen nuevos compuestos agonistas de la exendina en el documento WO 99/07404.

Otros nuevos agonistas de la exendina se describen en el documento WO 99/25727.

Otros nuevos agonistas de la exendina adicionales se describen en el documento WO 99/25728.

Otros avances recientes en la tecnología relacionada con la exendina se describen en el documento WO 99/40788.

La modificación de péptidos y proteínas terapéuticas con macrogol (PEG) puede suponer tanto ventajas como inconvenientes. A pesar de que la modificación con PEG permite mejorar el período de circulación, reducir la capacidad antigénica y la inmunogenia, aumentar la solubilidad, la resistencia a la proteólisis, aumentar la biodisponibilidad, reducir la toxicidad, aumentar la estabilidad y facilitar la formulación de péptidos (véase, Francis *et al.*, *International Journal of Hematology*, 68: 1 - 18, 1998), en la mayoría de casos los problemas con la pegilación suponen una disminución sustancial de la actividad biológica. *Id.* Además, la mayoría de procedimientos implican la utilización de ligadores que presentan diversos tipos de efectos adversos que comprenden inmunogenia, inestabilidad, toxicidad y reactividad. *Id.*

El glucagonoma (tumor de las células que secretan glucagón) provoca, además de la intolerancia a la glucosa, un trastorno cutáneo, el eritema necrolítico migratorio. Consiste en una erupción cutánea escamosa colorada, produciendo a veces ampollas y costras, que se localiza en el rostro, el abdomen, las extremidades y el perineo. Se puede relacionar asimismo la inflamación de la lengua y de la boca, y alteraciones en las uñas y disminución del cabello. Se ha indicado que el trastorno se produce a causa del octeótrido, un análogo de la hormona glucagonostática. Los compuestos descritos en la presente memoria resultan útiles asimismo como agentes glucagonostáticos y, por lo tanto, el tratamiento de dicha enfermedad, que fue descrita por primera vez en el año 1966 (Kaplan, L. M. *Endocrine Tumors of the Gastrointestinal Tract and Pancreas* [“Tumores endocrinos del tracto gastrointestinal y del páncreas”]. Cap. 262, pág. 1392. En *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12ª edición. McGraw-Hill Inc, Nueva York, 1991). Los compuestos descritos en la presente memoria que resultan útiles en la disminución de los niveles de glucagón y en la inhibición de la secreción de glucagón comprenden la exendina, los agonistas de la exendina y exendinas modificadas y agonistas modificados de la exendina y formulaciones relacionadas, y formas farmacéuticas.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a compuestos específicos para utilizar en la disminución de los niveles de glucagón y/o a la inhibición de la secreción de glucagón en un paciente. Dichos compuestos se pueden utilizar en el tratamiento de la hiperglucagonemia y cuadros clínicos que mejoran con la administración de agentes glucagonostáticos comprendiendo, pero sin limitarse al mismo, el eritema necrolítico migratorio.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto que es una exendina, un agonista de la exendina, una exendina modificada o un agonista modificado de la exendina para utilizar en la disminución terapéutica del glucagón plasmático en pacientes diabéticos o intolerantes a la glucosa con unos niveles de glucagón en plasma superiores a los de las personas sanas, en el que la exendina, el agonista de la exendina, la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina comprenden una secuencia de aminoácidos con la fórmula:

Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Gly Thr Xaa<sub>4</sub> Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Xaa<sub>7</sub> Xaa<sub>8</sub>

Ser Lys Gln Xaa<sub>9</sub> Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu

Xaa<sub>10</sub> Xaa<sub>11</sub> Xaa<sub>12</sub> Xaa<sub>13</sub> Leu X<sub>1</sub> Gly Gly Xaa<sub>14</sub>

Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>15</sub> Xaa<sub>16</sub> Xaa<sub>17</sub> Xaa<sub>18</sub>-Z

en la que,

Xaa<sub>1</sub> es His, Arg, Tyr o 4-imidazolpropionil;

Xaa<sub>2</sub> es Ser, Gly, Ala o Thr;

Xaa<sub>3</sub> es Asp o Glu;

Xaa<sub>4</sub> es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa<sub>5</sub> es Thr o Ser;

Xaa<sub>6</sub> es Ser o Thr;

Xaa<sub>7</sub> es Asp o Glu;

Xaa<sub>8</sub> es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met;

Xaa<sub>9</sub> es Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met;

Xaa<sub>10</sub> es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa<sub>11</sub> es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met;

Xaa<sub>12</sub> es Glu o Asp;

Xaa<sub>13</sub> es Trp, Phe, Tyr, o naftilalanina;

X<sub>1</sub> es Lys Asn, Asn Lys, Lys-NH<sup>ε</sup>-R Asn, Asn Lys-NH<sup>ε</sup>-R, en la que R es Lys, Arg, una cadena alcanoílo o cicloalquilalcanoílo lineal o ramificada C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>;



## ES 2 343 072 T3

Xaa<sub>23</sub> es Ile, Val o terc-butilglicina;

Xaa<sub>24</sub> es Ala, Glu o Asp;

5 Xaa<sub>25</sub> es Ala, Trp o Phe;

Xaa<sub>26</sub> es Ala o Leu;

Xaa<sub>27</sub> es Ala o Lys;

10 Xaa<sub>28</sub> es Ala o Asn;

Z<sub>1</sub> es

15 Gly Xaa<sub>31</sub>-Z<sub>2</sub>, Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser-Z<sub>2</sub>,

Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>36</sub>-Z<sub>2</sub>,

20 Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>36</sub> Xaa<sub>37</sub>-Z<sub>2</sub>,

Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>36</sub> Xaa<sub>37</sub> Xaa<sub>38</sub>-Z<sub>2</sub>;

siendo Xaa<sub>31</sub>, Xaa<sub>36</sub>, Xaa<sub>37</sub>, y Xaa<sub>38</sub> independientemente Pro, homoprolina, tioprolina o N-metilalanina;

25 y Z<sub>2</sub> es -OH o -NH<sub>2</sub>

a condición de que no más de 3 entre, Xaa<sub>3</sub>, Xaa<sub>5</sub>, Xaa<sub>6</sub>, Xaa<sub>8</sub>, Xaa<sub>9</sub>, Xaa<sub>10</sub>, Xaa<sub>11</sub>, Xaa<sub>12</sub>, Xaa<sub>13</sub>, Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub>, Xaa<sub>17</sub>, Xaa<sub>19</sub>, Xaa<sub>20</sub>, Xaa<sub>21</sub>, Xaa<sub>24</sub>, Xaa<sub>25</sub>, Xaa<sub>26</sub>, Xaa<sub>27</sub> y Xaa<sub>28</sub> sean Ala; y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

30 La presente invención se refiere asimismo a un compuesto que es una exendina, un agonista de la exendina, una exendina modificada o un agonista modificado de la exendina para utilizar en la disminución terapéutica del glucagón plasmático en pacientes diabéticos o intolerantes a la glucosa con unos niveles de glucagón en plasma superiores a los de las personas sanas, en el que el compuesto comprende la secuencia de aminoácidos de la exendina-3 o de la exendina-4. En una forma de realización preferida el compuesto comprende la secuencia de la exendina-4.

35 Se proporciona asimismo la utilización de un compuesto de la presente invención en la realización de un medicamento para utilizar en la disminución terapéutica del glucagón plasmático en pacientes diabéticos o intolerantes a la glucosa con unos niveles de glucagón en plasma superiores a los de las personas sanas.

40 En las formas de realización preferidas, la exendina es la exendina-4. En otras formas de realización preferidas, la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina presenta un peso molecular superior al de la exendina o del agonista de la exendina (preferentemente aproximadamente un 10%, 50% o 90% superior), la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina presentan una carga negativa superior a la carga negativa de la exendina o del agonista de la exendina (preferentemente aproximadamente un 10%, 50% o 90% superior), la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina presenta una depuración renal inferior a la depuración renal de la exendina o del agonista de la exendina (preferentemente aproximadamente un 10%, 50% o 90% inferior), la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina presenta una vida media superior a la de la exendina o del agonista de la exendina (preferentemente aproximadamente un 10%, 50% o 90% superior), la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina presenta una inmunogenia/capacidad antigénica inferior a la inmunogenia/capacidad antigénica de la exendina o del agonista de la exendina, la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina presenta una solubilidad superior a la solubilidad de la exendina o del agonista de la exendina (preferentemente aproximadamente un 10%, 50% o 90% superior), la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina presenta un índice de proteinólisis inferior al índice de proteinólisis de la exendina o del agonista de la exendina (preferentemente aproximadamente un 10%, 50% o 90% inferior), la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina presenta una toxicidad inferior a la toxicidad de la exendina o del agonista de la exendina, la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina presenta una estabilidad superior a la estabilidad de la exendina o del agonista de la exendina, y la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina presenta una permeabilidad/función biológica superior o inferior a la permeabilidad/función biológica de la exendina o del agonista de la exendina (preferentemente aproximadamente un 10%, 50% o 90% superior o inferior).

60 La exendina modificada o el agonista modificado de la exendina se pueden enlazar a uno, dos o tres polímeros de macrogol. Los polímeros de macrogol presentan preferentemente unos pesos moleculares comprendidos entre 500 y 20.000. En una forma de realización preferida, la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina es uno de los compuestos 201 a 217, más preferentemente uno de los compuestos 209, 210 y 213, o uno de los compuestos 201 y 202, o uno de los compuestos 216 y 217 (véase ejemplo 4, posteriormente).

Los polímeros de macrogol se enlazan preferentemente con un grupo amino, carboxilo o tio, y se pueden enlazar mediante el aminoácido aminoterminal o el aminoácido carboxiterminal de las cadenas laterales de lisina, ácido aspártico, ácido glutámico o cisteína, o alternativamente se pueden enlazar los polímeros de macrogol con grupos diamina y grupos dicarboxílicos. La exendina o el agonista de la exendina se enlaza preferentemente a los polímeros de macrogol mediante un grupo amino  $\varepsilon$  de una lisina de la exendina o del agonista de la exendina.

Por “agonista de la exendina” se entiende un compuesto que imita uno o más efectos de la exendina, por ejemplo, sobre la motilidad gástrica y el vaciado gástrico (concretamente un compuesto que se enlaza eficazmente con un receptor en el que la exendina efectúa su acción sobre la motilidad gástrica y el vaciado gástrico, preferentemente un análogo o un derivado de la exendina) o un compuesto, por ejemplo, que imita los efectos de la exendina en la reducción de la ingesta alimenticia al enlazarse con el receptor en el que la exendina efectúa dicho efecto. Los compuestos agonistas de la exendina preferidos comprenden los descritos en la solicitud de patente US n.º 90/003.869 titulada “*Use of Exendin and Agonists Thereof for the Reduction of Food Intake* (Empleo de la exendina y de los antagonistas de la misma en la reducción de la ingesta alimenticia)” presentada el 7 de enero de 1998, (y las solicitudes de prioridad con respecto a la misma) que goza de unos derechos de propiedad comunes con la presente solicitud. Los efectos de las exendinas o de los agonistas de las exendinas se pueden identificar, analizar o seleccionar utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria u otros procedimientos conocidos en la técnica para determinar los efectos de la exendina.

En otro aspecto, se puede administrar asimismo al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de la amilina.

Preferentemente, el paciente es un vertebrado, más preferentemente un mamífero y, en el caso más preferente, un humano. En una forma de realización, el paciente diabético presenta diabetes de tipo 1. En otra forma de realización, el paciente diabético presenta diabetes de tipo 2. La exendina, el agonista de la exendina, o la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina de la presente invención se pueden administrar por vía parenteral, más preferentemente mediante una inyección. En el aspecto más preferido, la inyección es una inyección periférica. Preferentemente se administran por día de aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  - 30  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 5 mg de exendina modificada o de agonista modificado de la exendina. Más preferentemente, se administran de aproximadamente 1 - 30  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 2 mg, o de aproximadamente 1 - 30  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 1 mg de exendina modificada o de agonista modificado de la exendina de la invención por día. Más preferentemente, se administran por día de aproximadamente 3  $\mu\text{g}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{g}$  de exendina modificada o del agonista modificado de la exendina.

Un agonista de la exendina preferido para la modificación y utilización comprende la  $^{14}\text{Leu}$ ,  $^{25}\text{Phe}$  exendina-4 amida [SEC. ID. n.º 7: His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly-NH<sub>2</sub>].

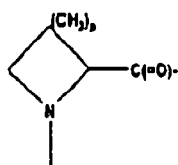
### Definiciones

Según la presente invención y tal como se emplean en el presente documento, los siguientes términos se definen con los siguientes significados excepto cuando se indique lo contrario.

El término “aminoácido” se refiere a los aminoácidos naturales, los aminoácidos sintéticos y los análogos de los aminoácidos, todos ellos en sus estereoisómeros D y L si su estructura permite dichas formas estereoisómeras. Los aminoácidos naturales comprenden la alanina (Ala), la arginina (Arg), la asparagina (Asn), el ácido aspártico (Asp), la cisteína (Cys), la glutamina (Gln), el ácido glutámico (Glu), la glicina (Gly), la histidina (His), la isoleucina (Ile), la leucina (Leu), la lisina (Lys), la metionina (Met), la fenilalanina (Phe), la prolina (Pro), la serina (Ser), la treonina (Thr), el triptófano (Trp), la tirosina (Tyr) y la valina (Val). Los aminoácidos sintéticos comprenden, sin limitarse a los mismos, el ácido azetidínicarboxílico, el ácido 2-aminoadípico, el ácido 3-aminoadípico, la  $\beta$ -alanina, el ácido aminopropiónico, el ácido 2-aminobutírico, el ácido 4-aminobutírico, el ácido 6-aminocaproico, el ácido 2-aminoheptanoico, el ácido 2-aminoisobutírico, el ácido 3-aminoisobutírico, el ácido 2-aminopimélico, la butilglicina terciaria, el ácido 2,4-diaminoisobutírico, la desmosina, el ácido 2,2'-diaminopimélico, el ácido 2,3-diaminopropiónico, la N-etilglicina, la N-etilasparagina, la homoprolina, la hidroxilisina, la alohidroxilisina, la 3-hidroxi prolina, la 4-hidroxi prolina, la isodesmosina, la aloisoleucina, la N-metilalanina, la N-metilglicina, la N-metilisoleucina, la N-metilpentilglicina, la N-metilvalina, la naftalanina, la novalina, la norleucina, la ornitina, pentilglicina, el ácido piperídico y la tioprolina. Los análogos de los aminoácidos comprenden los aminoácidos naturales y sintéticos que se encuentran químicamente bloqueados, reversible o irreversiblemente, o que se han modificado en su grupo amino aminoterminal o en sus grupos de cadena lateral, tal como por ejemplo, el sulfóxido de metionina, la metionina sulfona, la S-(carboximetil)-cisteína, el sulfóxido de S-(carboximetil)-cisteína y la S-(carboximetil)-cisteína sulfona.

El término “análogo aminoácido” se refiere a un aminoácido en el que el grupo carboxilo C-terminal, el grupo amino N-terminal o el grupo funcional de cadena lateral se han codificado químicamente en otro grupo funcional. Por ejemplo, el ácido aspártico - ( $\beta$ -metil éster) es un análogo aminoácido del ácido aspártico; la N-etilglicina es un análogo aminoácido de la glicina; o la alanina carboxamida es un análogo aminoácido de la alanina.

El término “residuo aminoácido” se refiere a radicales que presentan la estructura (1) -C(O)-R-NH-, en la que R normalmente es -CH(R')-, en la que R' es una cadena lateral del aminoácido, normalmente H o un carbono que contiene un sustituyente; o (2),



5

10 en el que p es 1, 2 ó 3 representando, respectivamente, residuos del ácido azetidincarboxílico, de la prolina o del ácido pipercolico.

15 El término “inferior” al que se hace referencia en el presente documento en relación con los radicales orgánicos tales como los grupos alquilo y define dichos grupos comprendiendo hasta aproximadamente 6 átomos de carbono inclusive, preferentemente hasta 4 átomos de carbono inclusive y ventajosamente uno o dos átomos de carbono. Dichos grupos pueden ser de cadena lineal o de cadena ramificada.

20 “Sal farmacéuticamente aceptable” comprende las sales de los compuestos descritos en el presente documento derivadas de la combinación de dichos compuestos y un ácido orgánico o inorgánico. En la práctica, el uso de la sal forma cantidades para utilizar en forma de base. Los compuestos resultan útiles tanto en forma de base libre como en forma de sal, considerándose ambas formas comprendidas dentro del alcance de la presente invención.

Además, las siguientes abreviaciones se aplican a los siguientes compuestos:

25 “ACN” o “CH<sub>3</sub>CN” se refiere al acetonitrilo.

“Boc”, “tBoc” o “Tboc” se refiere al t-butoxicarbonilo.

“DCC” se refiere a la N,N’-1-diciclohexilcarbodiimida.

30 “Fmoc” se refiere al fluorenilmetoxicarbonilo.

“HBTU” se refiere al hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametilurano.

35 “HOBT” se refiere al monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol.

“homoP” o “hPro” se refiere a la homoprolina.

“MeAla” o “Nme” se refiere a la N-metilalanina.

40 “naph” se refiere a la naftilalanina.

“pG” o “pGly” se refiere a la pentilglicina.

45 “tBuG” se refiere a la butilglicina terciaria.

“ThioP” o “tPro” se refiere a tioprolina.

“3Hyp” se refiere a la 3-hidroxirolina.

50 “4Hyp” se refiere a la 4-hidroxirolina.

“NAG” se refiere a la N-alquilglicina.

55 “NAPG” se refiere a la N-alquilepentilglicina.

“Norval” se refiere a la norvalina.

“Norleu” se refiere a la norleucina.

60 Otras características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto mediante la siguiente descripción de las formas de realización preferidas de la misma y mediante las reivindicaciones.

### Breve descripción de las figuras

65 La Figura 1 representa la secuencia de aminoácidos de la exendina-3 [SEC. ID. n.º 1].

La Figura 2 representa la secuencia de aminoácidos de la exendina-4 [SEC. ID. n.º 2].



La Figura 3 representa las secuencias de aminoácidos de determinados compuestos agonistas de la exendina útiles en la presente invención [SEC. ID. n.º 10 a 40].

La Figura 4 representa las secuencias de aminoácidos de determinados compuestos de la presente invención, los Compuestos 1 a 4.

La Figura 5 es un gráfico que ilustra el efecto de la nefrectomía funcional en la depuración de la exendina-4.

La Figura 6 es un gráfico que ilustra la disminución terminal de los niveles plasmáticos de exendina-4 en pacientes a los que se ha realizado una nefrectomía y en pacientes del grupo quirúrgico de referencia.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto para utilizar en la inhibición y/o la disminución del glucagón en un paciente, que comprende la administración de una exendina específica, de un agonista de la exendina, o de una exendina modificada o un agonista modificado de la exendina. Dichos compuestos son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de la hiperglucagonemia y otros cuadros clínicos en los que la disminución de los niveles de glucagón o la inhibición del glucagón resultan beneficiosos. Dichos trastornos comprenden, sin limitarse a los mismos, el glucagonoma y el eritrema necrolítico migratorio.

#### *Exendinas modificadas y agonistas modificados de la exendina*

Las exendinas modificadas y los agonistas modificados de la exendina de la presente invención comprenden, por ejemplo, uno o más polímeros de macrogol enlazados con una exendina específica o un agonista de la exendina, tales como una exendina natural, una exendina sintética o un agonista de la exendina.

#### *Exendina-4*

La exendina-4 es un péptido natural que se aísla a partir de las secreciones salivares del monstruo de Gila. Los ensayos realizados en animales con la exendina-4 han demostrado que su capacidad para disminuir el nivel de glucosa en sangre persiste durante varias horas. La exendina-4, un polipéptido de 39 aminoácidos, se sintetiza empleando una síntesis en fase sólida tal como se describe en la presente memoria, y se ha demostrado que este material sintético es idéntico a la exendina-4 natural.

Tal como se describe en el presente documento, se han estudiado diversos aspectos de la farmacología no clínica de la exendina-4. En el encéfalo, la exendina-4 se une principalmente al área postrema y a la región del núcleo del tracto solitario del romboencéfalo y al órgano subfornical del prosencéfalo. Se ha observado la unión de la exendina-4 en el encéfalo y riñón en ratas y en ratones. Se desconoce a qué estructuras se une la exendina-4 en el riñón.

Diversos experimentos han comparado las acciones biológicas de la exendina-4 y el GLP-1 y han demostrado una gama de propiedades más favorable para la exendina-4. Una dosis única subcutánea de exendina-4 disminuyó la glucosa plasmática en ratones db/db (diabéticos) y ob/ob (obesos diabéticos) hasta un 40%. En las ratas diabéticas Fatty Zucker (ZDF), 5 semanas de tratamiento con exendina-4 disminuyeron la HbA<sub>1c</sub> (una medida de la hemoglobina glucosilada utilizada para valorar los niveles de glucosa plasmática) hasta un 41%. La sensibilidad a la insulina también se vio mejorada en un 76% tras 5 semanas de tratamiento de ratas obesas ZDF. En primates intolerantes a la glucosa también se observaron descensos dependientes de la dosis en la glucosa plasmática.

Se ha observado asimismo una acción insulínica de la exendina-4 en roedores, mejorando la respuesta de la insulina a la glucosa en más de un 100% en ratas Harlan Sprague Dawley (HSD) sin ayunar, hasta aproximadamente unas 10 veces en ratones db/db sin ayunar. Un tratamiento previo con concentraciones superiores de glucosa plasmática se relacionó con unos mayores efectos en la disminución de la glucosa. De ese modo, el efecto observado en la exendina-4 al hacer descender la glucosa parece ser dependiente de la glucosa, y mínimo si los animales ya presentan euglucemia.

La exendina-4, en función de la dosis, disminuyó el vaciado gástrico en las ratas HSD y resultó ser aproximadamente 90 veces más potente que el GLP-1 para dicha acción. También se ha demostrado que la exendina-4 reduce la ingesta alimenticia en los ratones NIH/Sw (suizos) tras la administración periférica, y resultó por lo menos 1000 veces más potente que el GLP-1 para dicha acción. La exendina-4 redujo la concentración de glucagón en plasma en aproximadamente un 40% en ratas ZDF anestesiadas bajo unas condiciones de pinzamiento hiperinsulinémico e hiperglucémico, pero no afectó a las concentraciones de glucagón en ratas normales en condiciones de euglucemia. Se ha demostrado que la exendina-4, en función de la dosis, reduce el peso corporal en ratas ZDF obesas, mientras que en ratas ZDF delgadas, la disminución observada en el peso corporal parece ser transitoria.

Gracias a los efectos de disminuir e inhibir la secreción de glucagón, las exendinas, los agonistas de la exendina, y las exendinas modificadas o agonistas modificados de la exendina que comprenden la exendina-4, resultarán útiles en pacientes que se benefician de una disminución del glucagón, por ejemplo, en pacientes con glucagonoma y eritrema necrolítico migratorio, y en pacientes con diabetes tanto si conservan la capacidad de secretar insulina como no. Véase el ejemplo 5.

Se ha investigado la toxicología de la exendina-4 en estudios con dosis única en ratones, ratas, y monos, en estudios con dosis fraccionadas (hasta 28 dosis consecutivas diarias) en ratas y monos y en ensayos *in vitro* de acción mutágena y de alteraciones cromosómicas. Hasta la fecha, no se han producido fallecimientos, y no se han observado cambios relacionados con el tratamiento en la hematología, bioquímica, o cambios tisulares tanto macroscópicos como microscópicos. Se ha demostrado que la exendina-4 no es mutágena, y que no provoca aberraciones cromosómicas con las concentraciones empleadas en los ensayos (hasta 5000 µg/ml).

Apoyando la investigación de la farmacocinética no clínica y el metabolismo de la exendina-4, se ha desarrollado un cierto número de inmunoanálisis. En los estudios iniciales de farmacocinética se utilizó un radioinmunoanálisis con sensibilidad limitada (-100 pM). Posteriormente se validó un análisis inmunoradiométrico (IRMA) bilateral para la exendina-4 con un límite inferior de determinación cuantitativa de 15 pM. Se comprobó que la biodisponibilidad de la exendina-4, administrada por vía subcutánea, era aproximadamente del 50 al 80% empleando el radioinmunoanálisis. Ello resultó similar a lo observado tras la administración intraperitoneal (48 al 60%). Las concentraciones máximas de plasma ( $C_{máx}$ ) se produjeron entre 30 y 43 minutos ( $T_{máx}$ ). Los valores de  $C_{máx}$  y AUC se encontraban relacionados monótonamente con la dosis. La vida media aparente de la exendina-4 administrada por vía subcutánea fue aproximadamente de 90 a 110 minutos. Este valor es significativamente superior a los 14 a 41 minutos observados tras la administración intravenosa. Unos resultados similares se obtuvieron mediante el análisis IRMA. Los estudios sobre la degradación con exendina-4 en comparación con el GLP-1 indican que la exendina-4 es relativamente resistente a la degradación.

#### *Agonistas de la exendina*

Se investigó la relación de la actividad estructural (SAR) para analizar estructuras que se pueden encontrar relacionadas con la actividad antidiabética de la exendina, con respecto a su estabilidad con el metabolismo, y sobre la mejora de sus características físicas, especialmente en lo que concierne a la estabilidad del péptido y la susceptibilidad de sistemas de distribución alternativos, y se han realizado diversos compuestos peptídicos agonistas de la exendina. Los agonistas de la exendina comprenden análogos peptídicos de la exendina en los que uno o más aminoácidos naturales son eliminados o reemplazados con otro(s) aminoácido(s). Los agonistas preferidos de la exendina son agonistas análogos de la exendina-4. Los agonistas de la exendina particularmente preferidos comprenden los descritos en los documentos WO 99/07404, WO 99/25727 y WO 99/25728

Se puede indicar la actividad como agonistas de la exendina, por ejemplo, mediante la actividad de los análisis descritos a continuación. Se pueden identificar, analizar o seleccionar los efectos de las exendinas o de los agonistas de las exendinas en la motilidad gástrica y el vaciado gástrico utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria u otros procedimientos conocidos en la técnica para determinar los efectos de la exendina. Se pueden utilizar análisis de receptores negativos o pruebas de detección sistemática de compuestos agonistas de la exendina o compuestos candidatos a agonistas de la exendina, tal como un análisis/prueba de detección sistemática del receptor de la amilina utilizando una preparación con el receptor de la amilina tal como se describe en la patente US n.º 5.264.372, publicada el 23 de noviembre de 1993, uno o más análisis/pruebas de detección sistemática utilizando, por ejemplo, células T47D y MCF7 de carcinoma de mama, que contienen receptores del calcio asociados a la estimulación de la adenilciclasa y/o un análisis/prueba de detección sistemática del receptor de CGRP utilizando, por ejemplo, células SK-N-MC.

Uno de dichos procedimientos destinados a la identificación o el análisis de un compuesto para disminuir la motilidad gástrica comprende: (a) reunir una muestra analítica y un sistema analítico, comprendiendo la muestra analítica uno o más compuestos a analizar, comprendiendo el sistema analítico un sistema destinado a analizar la motilidad gástrica, caracterizándose el sistema en que presenta, por ejemplo, un nivel elevado de glucosa plasmática como respuesta a la introducción en el sistema de glucosa o de comida; y (b) determinar la presencia o la cantidad del incremento de glucosa plasmática en el sistema. Se pueden utilizar asimismo controles positivos y/o negativos.

Se comprende asimismo en el alcance de la presente invención las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos con la fórmula (I a III) y las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos y sales de los mismos para utilizarlos tal como se definen en la presente memoria

#### Fórmula I

Asimismo en el alcance de la presente invención se encuentran tipos de compuestos más específicos que presentan péptidos de diversas longitudes, por ejemplo aquellos tipos de compuestos que no comprenden péptidos con una longitud de 28, 29 ó 30 aminoácidos, respectivamente. Además, la presente invención comprende los tipos de compuestos más específicos descritos en el documento WO 99/25727 y que presentan unas secuencias de aminoácidos particulares, por ejemplo los compuestos de fórmula (I) [SEC. ID. n.º 43]:

## ES 2 343 072 T3

Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Gly Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Xaa<sub>7</sub> Xaa<sub>8</sub> Xaa<sub>9</sub> Xaa<sub>10</sub>  
Xaa<sub>11</sub> Xaa<sub>12</sub> Xaa<sub>13</sub> Xaa<sub>14</sub> Xaa<sub>15</sub> Xaa<sub>16</sub> Xaa<sub>17</sub> Ala Xaa<sub>18</sub> Xaa<sub>19</sub> Xaa<sub>20</sub>  
5 Xaa<sub>20</sub> Xaa<sub>21</sub> Xaa<sub>22</sub> Xaa<sub>23</sub> Xaa<sub>24</sub> Xaa<sub>25</sub> Xaa<sub>26</sub> Xaa<sub>27</sub> Xaa<sub>28</sub>-Z<sub>1</sub>;

en la que

10

Xaa<sub>1</sub> es His o Arg;

Xaa<sub>2</sub> es Gly o Ala;

15

Xaa<sub>3</sub> es Asp o Glu;

Xaa<sub>5</sub> es Ala o Thr;

20

Xaa<sub>6</sub> es Ala, Phe o naftilalanina;

Xaa<sub>7</sub> es Thr o Ser;

Xaa<sub>8</sub> es Ala, Ser o Thr;

25

Xaa<sub>9</sub> es Asp o Glu;

Xaa<sub>10</sub> es Ala, Leu o pentilglicina;

Xaa<sub>11</sub>, es Ala o Ser;

30

Xaa<sub>12</sub> es Ala o Lys;

Xaa<sub>13</sub> es Ala o Gln;

35

Xaa<sub>14</sub> es Ala, Leu o pentilglicina;

Xaa<sub>15</sub> es Ala o Glu;

Xaa<sub>16</sub> es Ala o Glu;

40

Xaa<sub>17</sub> es Ala o Glu;

Xaa<sub>19</sub> es Ala o Val;

45

Xaa<sub>20</sub> es Ala o Arg;

Xaa<sub>21</sub> es Ala o Leu;

Xaa<sub>22</sub> es Phe o naftilalanina;

50

Xaa<sub>23</sub> es Ile, Val o terc-butilglicina;

Xaa<sub>24</sub> es Ala, Glu o Asp;

55

Xaa<sub>25</sub> es Ala, Trp o Phe;

Xaa<sub>26</sub> es Ala o Leu;

Xaa<sub>27</sub> es Ala o Lys;

60

Xaa<sub>28</sub> es Ala o Asn;

65

## ES 2 343 072 T3

Z<sub>1</sub> es

Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala-Z<sub>2</sub>,

Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>36</sub>-Z<sub>2</sub>,

Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>36</sub> Xaa<sub>37</sub>-Z<sub>2</sub> o Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser

Gly Ala Xaa<sub>36</sub> Xaa<sub>37</sub> Xaa<sub>38</sub>-Z<sub>2</sub>;

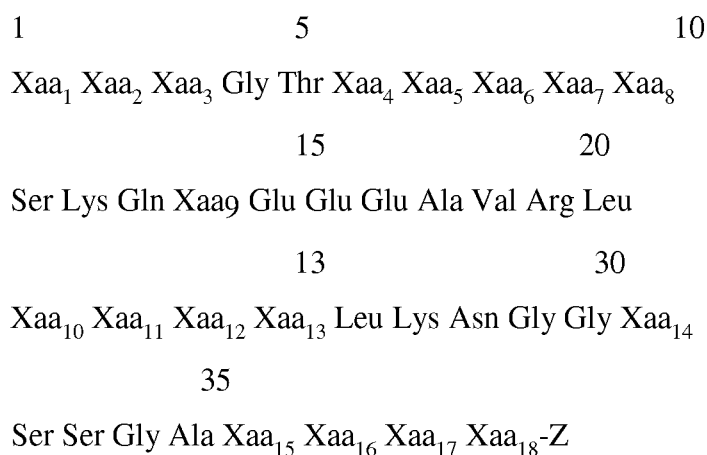
seleccionándose Xaa<sub>31</sub>, Xaa<sub>36</sub>, Xaa<sub>37</sub>, y Xaa<sub>38</sub> independientemente de entre el grupo que consiste en Pro, homoprolina, tioprolina o N-metilalanina; y

Z<sub>2</sub> es -OH o -NH<sub>2</sub>

a condición de que no más de tres entre, Xaa<sub>3</sub>, Xaa<sub>5</sub>, Xaa<sub>6</sub>, Xaa<sub>8</sub>, Xaa<sub>9</sub>, Xaa<sub>10</sub>, Xaa<sub>11</sub>, Xaa<sub>12</sub>, Xaa<sub>13</sub>, Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub>, Xaa<sub>17</sub>, Xaa<sub>19</sub>, Xaa<sub>20</sub>, Xaa<sub>21</sub>, Xaa<sub>24</sub>, Xaa<sub>25</sub>, Xaa<sub>26</sub>, Xaa<sub>27</sub> y Xaa<sub>28</sub> sean Ala; y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

### Fórmula II

Los compuestos particularmente útiles según la presente invención son los compuestos agonistas de la exendina descritos en la solicitud de patente US n.º 09/003.869, que comprenden los compuestos de fórmula (II) [SEC. ID. n.º 47]:



en la que Xaa<sub>1</sub> es His, Arg o Tyr; Xaa<sub>2</sub> es Ser, Gly, Ala o Thr; Xaa<sub>3</sub> es Asp o Glu; Xaa<sub>4</sub> es Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa<sub>5</sub> es Thr o Ser; Xaa<sub>6</sub> es Ser o Thr; Xaa<sub>7</sub> es Asp o Glu; Xaa<sub>8</sub> es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met; Xaa<sub>9</sub> es Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met; Xaa<sub>10</sub> es Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa<sub>11</sub> es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met; Xaa<sub>12</sub> es Glu o Asp; Xaa<sub>13</sub> es Trp, Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub> son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquiltentilglicina o N-alquilalanina; Xaa<sub>18</sub> es Ser, Thr o Tyr; y Z es -OH o -NH<sub>2</sub>; a condición de que el compuesto no presente la fórmula de la SEC. ID. n.º 1 ni de la SEC. ID. n.º 2. Los grupos N-alquilo preferidos para la N-alquilglicina, la N-alquiltentilglicina y la N-alquilalanina comprenden grupos alquilo de cadena corta preferiblemente con un número de átomos de carbono comprendido entre 1 y 6, más preferentemente con un número de átomos de carbono comprendido entre 1 y 4. Los compuestos adecuados comprenden aquellos que presentan las secuencias de aminoácidos de SEC. ID. n.º 10 al 40. También resultan útiles en la presente invención las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (II).

Los compuestos agonistas de la exendina comprenden aquellos en los que Xaa<sub>1</sub> es His o Tyr. Más preferentemente Xaa<sub>1</sub> es His.

Se prefieren aquellos compuestos en los que Xaa<sub>2</sub> es Gly.

Se prefieren aquellos compuestos en los que Xaa<sub>9</sub> es Leu, pentilglicina, o Met.

Se prefieren aquellos compuestos en los que Xaa<sub>13</sub> es Trp o Phe.

## ES 2 343 072 T3

Se prefieren asimismo aquellos compuestos en los que Xaa<sub>4</sub> es Phe o naftilalanina; Xaa<sub>11</sub> es Ile o Val y Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub> se seleccionan independientemente de entre Pro, homoprolina, tioprolina o N-alquilalanina. Preferentemente la N-alquilalanina presenta un grupo N-alquilo con un número de átomos de carbono comprendido entre 1 y 6.

5 Según un aspecto especialmente preferido Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub>, son el mismo aminoácido.

Se prefieren los compuestos en los que Xaa<sub>18</sub> es Ser o Tyr, más preferentemente Ser.

10 Preferentemente Z es -NH<sub>2</sub>.

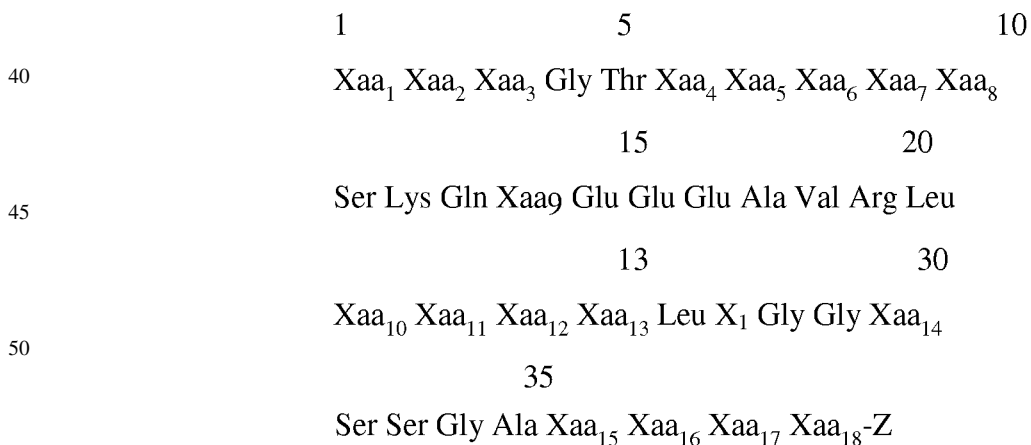
Según un aspecto, se prefieren los compuestos de fórmula (II) en los que Xaa<sub>1</sub> es His o Tyr, más preferentemente His; Xaa<sub>2</sub> es Gly; Xaa<sub>4</sub> es Phe o naftilalanina; Xaa<sub>9</sub> es Leu, pentilglicina o Met; Xaa<sub>10</sub> es Phe o naftilalanina; Xaa<sub>11</sub> es Ile o Val; Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub> se seleccionan independientemente de entre Pro, homoprolina, tioprolina o N-alquilalanina; y Xaa<sub>18</sub> es Ser o Tyr, más preferentemente Ser. En dicho aspecto, se prefiere que Xaa<sub>13</sub> sea Trp o Phe. Más preferentemente Z es -NH<sub>2</sub>.

Según un aspecto especialmente preferido, los compuestos especialmente preferidos comprenden aquellos de fórmula (II) en los que Xaa<sub>1</sub> es His o Arg; Xaa<sub>2</sub> es Gly; Xaa<sub>3</sub> es Asp o Glu; Xaa<sub>4</sub> es Phe o naftilalanina; Xaa<sub>5</sub> es Thr o Ser; Xaa<sub>6</sub> es Ser o Thr; Xaa<sub>7</sub> es Asp o Glu; Xaa<sub>8</sub> es Leu, o pentilglicina; Xaa<sub>9</sub> es Leu o pentilglicina; Xaa<sub>10</sub> es Phe o naftilalanina; Xaa<sub>11</sub> es Ile, Val o t-butilglicina; Xaa<sub>12</sub> es Glu o Asp; Xaa<sub>13</sub> es Trp o Phe; Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub> se seleccionan independientemente de entre Pro, homoprolina, tioprolina o N-metilalanina; Xaa<sub>18</sub> es Ser o Tyr; y Z es -OH o -NH<sub>2</sub>; a condición de que el compuesto no presente la fórmula ninguna de las secuencias SEC. ID. n.º 1 ó 2. Más preferentemente Z es -NH<sub>2</sub>. Los compuestos especialmente preferidos comprenden aquellos que presentan las secuencias de aminoácidos SEC. ID. n.º 10, 11, 22, 23, 24, 27, 29, 36, 37 y 40.

Según un aspecto especialmente preferido, se proporcionan los compuestos en los que Xaa<sub>9</sub> es Leu, Ile, Val o pentilglicina; más preferentemente Leu o pentilglicina; y Xaa<sub>13</sub> es Phe, Tyr, o naftilalanina, más preferentemente Phe o naftilalanina. Se considera que dichos compuestos presentan una duración de acción ventajosa y que son menos susceptibles de degradación oxidativa, tanto *in vitro*, como *in vivo*, así como durante la síntesis del compuesto.

### Fórmula III

Se proporcionan asimismo los compuestos descritos en el documento WO 99/07404, que comprenden los compuestos de fórmula (III) [SEC. ID. n.º 48]:



55 en la que Xaa<sub>1</sub> es His, Arg, Tyr o 4-imidazolpropionil; Xaa<sub>2</sub> es Ser, Gly, Ala o Thr; Xaa<sub>3</sub> es Asp o Glu; Xaa<sub>4</sub> es Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa<sub>5</sub> es Thr o Ser; Xaa<sub>6</sub> es Ser o Thr; Xaa<sub>7</sub> es Asp o Glu; Xaa<sub>8</sub> es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met; Xaa<sub>9</sub> es Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met; Xaa<sub>10</sub> es Phe, Tyr o naftilalanina; Xaa<sub>11</sub> es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met; Xaa<sub>12</sub> es Glu o Asp; Xaa<sub>13</sub> es Trp, Phe, Tyr o naftilalanina; X<sub>1</sub> es Lys Asn, Asn Lys, Lys-NH<sup>e</sup>-R Asn, Asn Lys-NH<sup>e</sup>-R, en la que R es Lys, Arg, una cadena alcanoilo o cicloalquilalcanoilo lineal o ramificada C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>; Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub> son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquilpentilglicina o N-alquilalanina; Xaa<sub>18</sub> es Ser, Thr o Tyr; y Z es -OH o -NH<sub>2</sub>; a condición de que el compuesto no presente la fórmula de la SEC. ID. n.º 1 ni de la SEC. ID. n.º 2. Los compuestos adecuados con la fórmula (III) comprenden los compuestos descritos en el documento WO 99/07404, que presentan las secuencias de aminoácidos SEC. ID. n.º 37 a 40 de la misma. Resultan asimismo útiles en la presente invención las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (III).

## ES 2 343 072 T3

Los compuestos agonistas de la exendina preferidos de fórmula (III) comprenden aquellos en los que Xaa<sub>1</sub> es His, Tyr o 4-imidazolpropionil. Más preferiblemente Xaa<sub>1</sub> es His o 4-imidazolpropionil.

Se prefieren aquellos compuestos de fórmula (III) en los que Xaa<sub>2</sub> es Gly.

Se prefieren aquellos compuestos de fórmula (III) en los que Xaa<sub>9</sub> es Leu, pentilglicina, o Met.

Se prefieren aquellos compuestos de fórmula (III) en los que Xaa<sub>13</sub> es Trp o Phe.

Se prefieren asimismo aquellos compuestos de fórmula (III) en los que X<sub>1</sub> es Lys Asn o Lys-NH<sup>e</sup>-R Asn, en la que R es Lys, Arg, una cadena alcanoilo o cicloalquilalcanoilo lineal o ramificada C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>.

Se prefieren asimismo aquellos compuestos de fórmula (III) en los que Xaa<sub>4</sub> es Phe o naftilalanina; Xaa<sub>10</sub> es Phe o naftilalanina; Xaa<sub>11</sub> es Ile o Val y Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub> se seleccionan independientemente de entre Pro, homoprolina, tioprolina o N-alquilalanina. Según un aspecto especialmente preferido Xaa<sub>18</sub> es Ser o Tyr. Se prefieren aquellos compuestos en los que Xaa<sub>18</sub> es Ser. Preferentemente Z es -NH<sub>2</sub>.

Según un aspecto preferido, se prefieren los compuestos de fórmula (III) en los que Xaa<sub>4</sub> es Phe o naftilalanina; Xaa<sub>10</sub> es Phe o naftilalanina; Xaa<sub>11</sub> es Ile o Val, X<sub>1</sub> es Lys Asn o Lys-NH<sup>e</sup>-R Asn, en la que R es Lys, Arg, una cadena alcanoilo o cicloalquilalcanoilo lineal o ramificada C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>, Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub> se seleccionan independientemente de entre Pro, homoprolina, tioprolina o N-alquilalanina.

### *Preparación de las exendinas modificadas y de los agonistas modificados de la exendina*

Las exendinas modificadas y los agonistas modificados de la exendina de la presente invención se pueden realizar enlazando uno o más polímeros de macrogol a una exendina o a un agonista de la exendina. La síntesis de las exendinas y de los agonistas de la exendina se describe, por lo tanto, en primer lugar, y a continuación la metodología de enlace entre lo(s) polímero(s) de macrogol a la exendina o agonista de la exendina.

### *Preparación de las exendinas y los agonistas de la exendina*

Las exendinas y agonistas de la exendina descritos en la presente memoria pueden prepararse empleando técnicas de purificación de péptidos tal como se describen, por ejemplo, en Eng, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265: 20259 - 62, 1990; Eng, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267: 7402 - 05, 1992. Alternativamente, se pueden preparar los péptidos de las exendinas y de los agonistas de la exendina mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia tales como, por ejemplo, los que se describen en Raufman, *et al.*, (*J. Biol. Chem.* 267: 21432 - 37, 1992), utilizando técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida normales y preferentemente un sintetizador de péptidos automático o semiautomático. Los compuestos que constituyen los principios activos de las formulaciones y formas farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar utilizando técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida normales y preferentemente un sintetizador de péptidos automático o semiautomático. Por regla general, cuando se utilizan dichas técnicas, se enlazan un aminoácido protegido por el grupo  $\alpha$ -N-carbamoilo y un aminoácido unido a la cadena peptídica en crecimiento, a una resina, a temperatura ambiente en un disolvente inerte tal como la dimetilformamida, la N-metilpirrolidinona o el cloruro de metileno en presencia de agentes de enlace tales como la dicitclohexilcarbodiimida y el 1-hidrozibenzotriazol en presencia de una base tal como la diisopropiletilamina. El grupo protector  $\alpha$ -N-carbamoilo se elimina del complejo resina - péptido que se ha producido empleando un reactivo tal como el ácido trifluoacético o la piperidina, y la reacción de enlace se repite con el siguiente aminoácido N-protegido que se pretende añadir a la cadena peptídica. Los grupos N-protectores aptos resultan muy conocidos en la técnica, siendo los preferidos en el presente documento el t-butiloxycarbonil (tBoc) y el fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc).

Los disolventes, los derivados de aminoácidos y la resina de 4-metilbenzohidrilamina utilizados en el sintetizador de péptidos se pueden adquirir en Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA). Los siguientes aminoácidos protegidos por cadena lateral se pueden adquirir en Applied Biosystems Inc.: BSD-112344.1-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). La Boc-His (BOM) se puede adquirir en Applied Biosystems, Inc. o en Bachem Inc. (Torrance, CA). El anisol, el sulfuro de dimetilo, el fenol, el etanoditiol, y el tioanisol se pueden obtener en Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI). Air Products and Chemicals (Allentown, PA) suministra HF. El éter etílico, el ácido acético y el metanol pueden adquirirse en Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

La síntesis de péptidos en fase sólida se puede realizar en un sintetizador de péptidos automático (Modelo 430A, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) utilizando el sistema NMP/HOBt (opción 1) y la química del tBoc o del Fmoc (véase, *Applied Biosystems User's Manual* ["Manual del usuario de biosistemas aplicados"] para el sintetizador de péptidos ABI 430A, Versión 1.3B, 1 de julio de 1988, sección 6, p. 49 - 70, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) con recubrimiento. La escisión de las resinas peptídicas Boc se puede realizar con HF (-50°C a 0°C, 1 hora). El péptido se puede extraer de la resina alternando con agua y ácido acético, y liofilizando los filtrados. La escisión de las resinas de péptido - Fmoc se puede realizar según los procedimientos estándar (*Introduction to Cleavage Techniques* ["Introducción a las técnicas de escisión"], Applied Biosystems, Inc., 1990, p. 6 - 12). Los péptidos también se pueden ensamblar empleando un sintetizador Advanced Chem Tech Synthesizer (Modelo MPS 350, Louisville, Kentucky).

Los péptidos se pueden purificar mediante RP-HPLC (de preparación y analítica) utilizando un sistema Waters Delta Prep 3000. Para aislar los péptidos se puede utilizar una columna de preparación C4, C8 o C18 (10  $\mu$ , 2,2 x 25 cm; Vydac, Hesperia, CA) y la pureza se puede determinar empleando 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 llevarse a la columna analítica con un índice de flujo de 1,0 ml/min y a la columna de preparación a 15 ml/min. Los análisis de aminoácidos se pueden realizar en un sistema Waters Pico Tag y procesarse empleando el programa Maxima. Los péptidos se pueden hidrolizar mediante hidrólisis ácida en fase de vapor (115°C, 20 - 24 h). Se pueden derivar los hidrolizados y analizarse mediante procedimientos estándar (Cohen, *et al.*, *The Pico Tag Method: A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis* ("El procedimiento Pico Tag: un manual de técnicas avanzadas para el análisis de los aminoácidos"), p. 11 - 52, Millipore Corporation, Milford, MA (1989)). El bombardeo de átomos rápidos se puede llevar a cabo mediante un M-Scan, Incorporated (West Chester, PA). La calibración de masas se puede realizar empleando yoduro de cesio o yoduro de cesio y glicerina. El análisis de ionización por desorción de plasma empleando la detección del tiempo de vuelo se puede realizar en un espectrómetro de masas Applied Biosystems Bio-Ion 20. La espectroscopia de masas por electroaspersión se puede llevar a cabo en un aparato VG Trio.

Los compuestos de los principios activos peptídicos útiles en las formulaciones y las formas farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar también empleando técnicas de ADN recombinante, utilizando métodos actualmente conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* ("Clonación molecular: manual de laboratorio"), 2ª Ed., Cold Spring Harbor (1989). Alternativamente, dichos compuestos se pueden preparar mediante procedimientos de síntesis peptídica en fase homogénea. Los compuestos no peptídicos útiles en la presente invención se pueden preparar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los aminoácidos que contengan fosfato y los péptidos que contengan dichos aminoácidos se pueden preparar utilizando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Bartlett y Landen, *Biorg. Chem.* 14: 356 - 377 (1986).

#### *Conjugación de polímeros de macrogol*

Existen diversas estrategias para enlazar el PEG con péptidos y proteínas. Véase *Int. J. Hematology* 68: 1 (1998); *Bioconjugate Chem* 6: 150 (1995) y *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys.* 9: 249 (1992). Los expertos en la materia podrán, por lo tanto, utilizar dichas técnicas muy conocidas para enlazar uno o más polímeros de macrogol a las exendinas y los agonistas de la exendina descritos en la presente memoria. Los polímeros adecuados del macrogol habitualmente se encuentran disponibles comercialmente o se pueden realizar mediante técnicas muy conocidas por los expertos en la materia. Los polímeros de macrogol presentan preferentemente unos pesos moleculares comprendidos entre 500 y 20.000 y pueden ser polímeros de cadena lineal o ramificada.

La unión del macrogol a un péptido o proteína intactos se puede alcanzar enlazándose a grupos amino, carboxilo o tiol. Dichos grupos se encontrarán habitualmente en el N y el C terminales y en las cadenas laterales de dichos aminoácidos naturales tales como la lisina, el ácido aspártico, el ácido glutámico y la cisteína. Debido a que la exendina 4 y otras exendinas y agonistas de la exendina pueden ser preparados mediante procedimientos de química de péptidos en fase sólida, se pueden introducir para conjugar con el macrogol diversas regiones que contiene grupos diamino y dicarboxílico con grupos protectores ortogonales.

La presente descripción proporciona asimismo la conjugación de una exendina o agonista de la exendina a uno o más polímeros distintos del macrogol que pueden regular la depuración renal de un modo similar al macrogol. Los ejemplos de dichos polímeros comprenden la albúmina y la gelatina. Véase Gombotz y Pettit, *Bioconjugate Chem* 6: 332 - 351, 1995.

#### *Utilidad*

Las formulaciones y formas farmacéuticas descritas en la presente memoria resultan útiles gracias a sus propiedades farmacológicas. En particular, los compuestos descritos en la presente memoria presentan actividad como agentes reductores de los niveles de glucagón e inhibidores de la secreción de glucagón, tal como se pone de manifiesto mediante su capacidad para disminuir los niveles de glucagón en animales y en seres humanos. Se pueden utilizar en el tratamiento de trastornos o enfermedades que se pueden mitigar reduciendo los niveles de glucagón e inhibiendo la secreción de glucagón.

Los compuestos a los que se ha hecho referencia anteriormente pueden formar sales con diversos ácidos y bases inorgánicos y orgánicos. Dichas sales comprenden las 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>, el ácido trifluoacético, el ácido acético, el ácido fórmico, el ácido metanosulfónico, el ácido toluenosulfónico, el ácido maleico, el ácido fumárico, el ácido canforsulfónico. Las sales preparadas con bases comprenden las sales amónicas, las sales de metales alcalinos, por ejemplo, las sales de sodio y potasio, y las sales alcalinotérricas, por ejemplo, las sales de calcio y magnesio. Se prefieren las sales de acetato, hidrocloreto y trifluoacetato. Se pueden realizar las sales mediante sistemas convencionales, tales como haciendo reaccionar las formas del producto como ácido o base libre con uno o más equivalentes de la base o ácido adecuado en un disolvente o medio

en el que la sal es insoluble, o en un disolvente tal como agua que a continuación se elimina *al vacío* o mediante liofilización o mediante intercambio de iones de una sal existente con otro ion de una resina adecuada de intercambio de iones.

5

#### Formulación y administración

Las formulaciones y formas farmacéuticas de la exendina modificada y de los agonistas modificados de la exendina de la presente invención resultan útiles gracias a sus efectos análogos a los de la exendina, y se pueden suministrar convenientemente en la forma de formulaciones aptas para la administración parenteral (comprendiendo la intravenosa, intramuscular y subcutánea). También se describen en la presente memoria formulaciones y formas farmacéuticas útiles en vías de administración alternativas, comprendiendo la oral, la nasal, la bucal, la sublingual y la pulmonar.

La viabilidad de las vías alternativas de administración para la exendina-4 se ha analizado determinando el nivel de exendina-4 en la circulación junto con la observación de la respuesta biológica, tal como la disminución de la glucosa plasmática en animales diabéticos, tras su administración. Se ha investigado el tránsito de la exendina-4 a través de diversas superficies, el tracto respiratorio (por las vías intranasal, endotraqueal y pulmonar) y el digestivo (por la vía sublingual, mediante alimentación por sonda nasogástrica, y por la vía intraduodenal). Los efectos biológicos y la aparición de la exendina-4 en sangre se han observado con cada vía de administración del tracto respiratorio y por la vía sublingual y la sonda nasogástrica en el tracto gastrointestinal. Se han descrito la administración endotraqueal, la administración intranasal, la administración por el tubo digestivo y la administración sublingual.

En algunos casos, resultará conveniente suministrar la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina y otro agente antiglucagón, tal como la amilina o un agonista de la amilina, en una composición o disolución única para su administración conjunta. En otros casos, resultará más ventajoso administrar el agente antiglucagón separadamente de dicha exendina o agonista de la exendina, o exendina modificada o agonista modificado de la exendina. En otros casos, puede resultar beneficioso proporcionar una exendina, agonista de la exendina, o exendina modificada o agonista modificado de la exendina tanto en formulación conjunta como separadamente con otros agentes que disminuyen el nivel de glucagón tales como la amilina. El formato de administración adecuado lo puede determinar de un mejor modo el médico para cada paciente en particular. Los transportadores farmacéuticamente aceptables y sus formulaciones se describen en los tratados habituales de formulación farmacéutica, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences* ("Ciencia Farmacéutica de Remington") por E. W. Martin. Véase también Wang, Y. J. y Hanson, M. A. *Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers* ("Formulaciones parenterales de proteínas y péptidos: estabilidad y estabilizadores"), *Journal of Parenteral Science and Technology*, Informe técnico n.º 10, Supl. 42: 2S (1988).

Los compuestos útiles en la presente invención se pueden proporcionar como composiciones parenterales para su inyección o venoclisis. Se pueden, por ejemplo, suspender en un aceite inerte, resultando adecuado un aceite vegetal tal como el aceite de sésamo, de cacahuete, de oliva o cualquier otro transportador aceptable. Preferentemente, se suspenden en un vehículo acuoso, por ejemplo, en una disolución amortiguadora isotónica a un pH comprendido entre aproximadamente 5,6 y 7,4. Dichas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o se pueden filtrar en medio estéril. Las composiciones pueden comprender sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiera para acercarse a las condiciones fisiológicas, tales como los agentes amortiguadores del pH. Los amortiguadores útiles comprenden, por ejemplo, las disoluciones amortiguadoras de acetato de sodio y ácido acético. Se puede utilizar una forma de preparación de liberación lenta a modo de depósito o "almacén" de tal modo que las cantidades terapéuticamente efectivas de la preparación lleguen al torrente circulatorio durante varias horas o días tras la inyección transdérmica u otra forma de administración.

Se puede alcanzar la isotonicidad empleando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente aceptables tales como la glucosa, el ácido bórico, el tartrato de sodio, el propilenglicol, polioles (como el manitol y el sorbitol), u otros solutos inorgánicos u orgánicos. Se prefiere en particular el cloruro de sodio para las disoluciones amortiguadoras que contienen iones de sodio.

Los compuestos reivindicados se pueden formular asimismo como sales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, sales de adición de ácidos) y/o complejos de los mismos. Son sales farmacéuticamente aceptables las sales atóxicas a la concentración a la que se administran. La preparación de dichas sales puede facilitar su uso farmacéutico al alterar las características fisicoquímicas de la composición sin impedir que ésta ejerza su efecto fisiológico. Los ejemplos de alteraciones útiles de las propiedades físicas comprenden la disminución del punto de fusión para facilitar la administración transmucosa y el aumento de la solubilidad para facilitar la administración de mayores concentraciones del fármaco.

Las sales farmacéuticamente aceptables comprenden las sales de adición de ácidos tales como aquellas que contienen sulfato, hidrocloreto, fosfato, sulfamato, acetato, citrato, lactato, tartrato, metanosulfonato, etanosulfonato, benzenosulfonato, *p*-toluenosulfonato, ciclohexilsulfamato y las sales de quinina. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse a partir de ácidos como el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido fosfórico, el ácido sulfámico, el ácido acético, el ácido cítrico, el ácido láctico, el ácido tartárico, el ácido malónico, el ácido metanosulfónico, el ácido etanosulfónico, el ácido benzenosulfónico, el ácido *p*-toluenosulfónico, el ácido ciclohexilsulfámico, y el áci-



## ES 2 343 072 T3

do de quinina. Dichas sales se pueden preparar, por ejemplo, haciendo reaccionar el producto en forma de ácido o base libre con uno o más equivalentes de la base o ácido apropiados en un disolvente o en un medio en el que la sal sea insoluble, o en un disolvente como el agua que a continuación se elimina al vacío o por liofilización o mediante el intercambio de iones de una sal existente con otro ion o un ion en una resina de intercambio de iones adecuada.

También se pueden utilizar vehículos o excipientes para facilitar la administración del compuesto. Los ejemplos de vehículos y excipientes comprenden el carbonato de calcio, el fosfato de calcio, diversos glúcidos como la lactosa, la glucosa, o la sacarosa, o diversos tipos de almidón, derivados de la celulosa, gelatina, aceites vegetales, macrogoles y disolventes fisiológicamente compatibles. Las composiciones o la composición farmacéutica se pueden administrar por distintas vías comprendiendo la intravenosa, la intraperitoneal, la subcutánea, y la intramuscular, por vía oral, tópica o transmucosa.

Si se pretende de este modo, las disoluciones de las composiciones de las anteriores composiciones se pueden espesar mediante un agente espesante tal como la metilcelulosa. Se pueden preparar en forma de emulsión, tanto de agua en aceite como de aceite en agua. Se puede emplear una amplia variedad de agentes emulsionantes farmacéuticamente aceptables que comprenden, por ejemplo, la goma arábiga, o un agente tensioactivo no iónico (tal como el Tween), o un agente tensioactivo iónico (tal como los sulfatos o sulfonatos de alcohol poliéter alcalino, por ejemplo, el Tritón).

Las composiciones útiles de la presente invención se preparan mezclando los ingredientes siguiendo procedimientos generalmente aceptados. Por ejemplo, los componentes seleccionados se pueden mezclar simplemente en una máquina mezcladora o en cualquier otro aparato estándar para producir una mezcla concentrada que se puede ajustar a la concentración y a la viscosidad finales mediante la adición de agua o de un agente espesante y posiblemente una disolución amortiguadora para controlar el pH o un soluto adicional para controlar la tonicidad.

Para poder ser utilizados por el médico, los compuestos se suministrarán en una forma farmacéutica que contenga una cierta cantidad de exendina, de un agonista de la exendina, o de una exendina modificada o de un agonista modificado de la exendina, con o sin otro agente antiglucagónico. Las cantidades terapéuticamente efectivas de exendina, de agonista de la exendina, o de exendina modificada o agonista modificado de la exendina para utilizar en el control del nivel de glucagón y en las condiciones en las que se reducen o se regulan beneficiosamente los niveles de glucagón son aquellas que disminuyen los niveles pospandriales de glucagón en sangre tal como se pretende. En pacientes diabéticos o intolerantes a la glucosa, los niveles plasmáticos de glucagón han de ser superiores a las de los pacientes normales. En dichos pacientes, se puede alcanzar una reducción beneficiosa o "suavizado" de los niveles pospandriales de glucagón en sangre. Tal como reconocerán los expertos en la materia, la cantidad efectiva de agente terapéutico variará en función de diversos factores, entre ellos la edad y el peso del paciente, la condición física del paciente, el nivel de glucagón o el nivel de reducción de la inhibición del glucagón a obtener, y de otros factores.

Dichas composiciones farmacéuticas resultan útiles al provocar la disminución del nivel de glucagón en los pacientes y se pueden utilizar asimismo en otros trastornos en los que se reduce beneficiosamente o se inhibe el glucagón.

La dosificación antiglucagón diaria eficaz de los compuestos se encontrará normalmente comprendida entre 0,01 ó 0,03 y 5 mg/día, preferentemente, entre 0,01 ó 0,5 y 2 mg/día, y más preferentemente entre 0,01 ó 0,1 y 1 mg/día, para un paciente de 70 kg, administrada en una dosis única o en dosis repartidas. La dosis exacta a administrar la determina el médico adjunto y depende de dónde se encuentre el compuesto particular dentro de los intervalos indicados anteriormente, así como de la edad, del peso y del estado del paciente. La administración se ha de iniciar cuando aparecen los primeros síntomas o poco después de que se ha diagnosticado, por ejemplo, diabetes mellitus puesta de manifiesto mediante un nivel elevado de glucagón. La administración se puede realizar por inyección, preferentemente subcutánea o intramuscular. Los compuestos activos orales pueden tomarse por vía oral, sin embargo las dosificaciones han de incrementarse de 5 a 10 veces.

Generalmente, al tratar o prevenir unos niveles pospandriales elevados, inadecuados o indeseados de glucagón en sangre, los compuestos de la presente invención se pueden administrar a pacientes que necesiten dicho tratamiento en unas dosificaciones similares a las proporcionadas anteriormente, sin embargo, los compuestos se administran con más frecuencia, por ejemplo, una, dos o tres veces al día. Se prefieren en particular las formulaciones de exendina y de agonistas de la exendina y las dosificaciones y vías de administración de las mismas que se describen en la solicitud de patente provisional US n.º 60/116.380.

La formulación y el modo óptimo de administración de los compuestos de la presente solicitud para un paciente dependen de factores conocidos en la técnica tales como una enfermedad o un trastorno en particular, el efecto que se pretende y el tipo de paciente. Aunque los compuestos se utilizarán habitualmente para tratar pacientes humanos, se pueden utilizar también para tratar enfermedades similares o idénticas en otros vertebrados tales como los primates, los animales de granja tales como los cerdos, ganado y aves de corral, y los animales de caza y domésticos tales como caballos, perros y gatos.

Para ayudar a la comprensión de la presente invención se incorporan los siguientes Ejemplos que describen los resultados de una serie de experimentos. Los experimentos relacionados con la presente invención, por supuesto, no deben interpretarse como específicamente restrictivos de la presente invención y las variaciones de la presente

## ES 2 343 072 T3

invención, desconocidas o que se desarrollen posteriormente, que pueden encontrarse en el campo de los expertos en la materia, se considera que caen dentro del alcance de la presente invención tal como se describe en la presente memoria y tal como se reivindica posteriormente.

### 5 Ejemplo 1

#### *Preparación de la exendina-3*

10 His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys  
Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser-NH<sub>2</sub> [SEC. ID. n. 1]

15 El péptido amidado anterior se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmol/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.). En general, se utilizaron ciclos de enlace único durante todo el proceso de síntesis y se utilizó una bioquímica Fast Moc (activación HBTU). La desprotección (eliminación del grupo Fmoc) de la cadena peptídica en crecimiento se consiguió empleando piperidina. La desprotección final de la resina peptídica completa se consiguió utilizando una mezcla de trietilsilano (0,2 ml), etanoditiol (0,2 ml), anisol (0,2 ml), agua (0,2 ml) y ácido trifluoacético (15 ml) siguiendo procedimientos estándar (*Introduction to Cleavage Techniques*, Applied Biosystems, Inc.). El péptido se  
20 precipitó en éter y agua (50 ml) y se centrifugó. Se reconstituyó el precipitado en ácido acético glacial y se liofilizó. El péptido liofilizado se disolvió en agua. La tasa bruta de pureza fue del 75% aproximadamente.

25 En las etapas de purificación y análisis de los Ejemplos 1 y 2 se utilizaron el Disolvente A (0,1% de TFA en agua) y el Disolvente B (0,1% de TFA en ACN).

30 La disolución que contenía el péptido se aplicó a una columna de preparación C-18 y se purificó (del 10% al 40% de Disolvente B en el Disolvente A durante unos 40 minutos). La pureza de las fracciones se determinó isocráticamente empleando la columna analítica C-18. Las fracciones puras se juntaron proporcionando el péptido anteriormente identificado. La analítica mediante RP-HPLC (gradiente del 30% al 60% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) de péptido liofilizado proporcionó un producto peptídico con un período de retención observado de 19,2 minutos.

### 35 Ejemplo 2

#### *Preparación de la exendina-4*

40 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys  
Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser-NH<sub>2</sub> [SEC. ID. n.° 2]

45 El péptido amidado anterior se ensambló en resina MBHA de 4-(2'-4'-dimetoxifenil)-Fmoc aminometil fenoxi acetamida norleucina (Novabiochem, 0,55 mmol/g) empleando aminoácidos protegidos con Fmoc (Applied Biosystems, Inc.), se realizó la escisión de la resina, se desprotegió y se purificó de un modo similar al que se ha descrito en el Ejemplo 1 en relación con la exendina-3. En los análisis se utilizaron el Disolvente A (0,1% de TFA en agua) y el Disolvente B (0,1% de TFA en ACN). La analítica mediante RP-HPLC (gradiente del 36% al 46% de Disolvente B en Disolvente A durante unos 30 minutos) de péptido liofilizado proporcionó un producto peptídico con un período de retención observado de 14,9 minutos. La espectrometría de masas por electroaspersión (M): calculado 4186,6; encontrado 4186,0 a 4186,8 (cuatro lotes).

### 50 Ejemplo 3

#### *Depuración renal*

55 Los riñones desempeñan un papel importante en la eliminación de determinadas moléculas (fármacos, péptidos, proteínas). En el caso de algunas moléculas, dicho proceso se inicia cuando el riñón filtra la sangre en los glomérulos para producir el ultrafiltrado que se describe posteriormente. La filtración glomerular permite distinguir no únicamente en función del peso molecular sino también actuando como barrera selectiva cargada negativamente, provocando la retención de los compuestos aniónicos. La fracción libre de moléculas en el plasma (que no se encuentran enlazadas a proteínas) con un peso molecular inferior a 5 kD y un radio real inferior a 15 Å se filtra con facilidad. En el caso de moléculas con un peso molecular superior se filtran sobre una base más restrictiva y limitada, principalmente en función del tamaño molecular, estructura y carga neta. El límite de la filtración glomerular se encuentra entre la albúmina (67 kD) que se retiene y la hemoglobina (68 kD) que se filtra. La albúmina, con un radio real de aproximadamente 36 Å, se filtra en una cantidad inferior al 1% en el glomérulo.

65 Una vez se encuentra en el glomérulo, una molécula se desplaza hacia el túbulo proximal en el que o bien se reabsorbe o bien continúa por el asa de Henle hacia el túbulo distal en el que los túbulos colectores extraen el filtrado hacia la vejiga. Las proteínas y péptidos filtrados se escinden habitualmente mediante enzimas de ribete en cepillo del

túbulo proximal, desde donde se recuperan eficazmente mediante cotransportadores sódicos y amínicos (bombas de eliminación). De lo contrario, las moléculas polares, ionizadas y con un peso molecular grande no se reabsorberán. Durante dicho proceso los enzimas metabolizantes de la corteza renal (túbulos proximales) pueden degradar también la molécula en más moléculas polares, aumentando por lo tanto su probabilidad de excreción en la orina. Muchas

5 hormonas peptídicas (por ejemplo, la amilina, las calcitoninas) se degradan al pasar a través de la circulación renal, probablemente mediante ectoenzimas vasculares accesibles al plasma, independientemente del proceso de la filtración glomerular. En dichos ejemplos, los índices de depuración renal del plasma resultan similares al índice de flujo plasmático renal, que es 3 veces superior que el índice de filtración glomerular.

10 Los estudios realizados para identificar los metabolitos de la exendina 4 que circulan por el plasma proporcionaron muy pocos indicios de degradación proteolítica; tras introducir grandes dosis intravenosas en animales, el análisis del plasma mediante HPLC mostró únicamente la presencia de exendina intacta y la aparición de picos “derivados” insignificantes que indicaban la concentración de productos de degradación.

15 Ello contrasta con otros péptidos estudiados (por ejemplo la amilina y el GLP-1) en los que la desaparición del pico de HPLC “original” se asoció con la aparición de los picos de HPLC “derivados”, que se identificaron posteriormente como productos de degradación subpeptídicos. La ausencia de productos de degradación de la exendina en plasma indica que se ha producido muy poca o ninguna proteólisis en ningún lugar, comprendiendo la circulación renal. Cualquier depuración por parte de los riñones, por lo tanto, se produce mediante sistemas no proteolíticos, principalmente

20 por filtración o por excreción activa (tal como tiene lugar con el para-amino hipurato).

Las determinaciones iniciales de la depuración de la exendina en humanos (120 - 130 ml/min), simios (~9 ml/min) y ratas (3,2 - 4,4 ml/min) coincidieron con los índices de filtración glomerular descritos para dichas especies. Para analizar si la filtración renal podía constituir el modo principal de eliminación de la exendina, se realizaron unos

25 estudios en machos de rata nefrectomizados que se habían mantenido en ayunas durante la noche a los que se realizaba una venoclis de exendina con un ritmo constante. El equilibrio dinámico de los niveles plasmáticos de exendina-4 se incrementó enormemente en las ratas nefrectomizadas en comparación con las ratas que conservaban sus riñones intactos. Estos datos indican que los riñones eran responsables de por lo menos el 80% de la depuración de la exendina 4 (véanse Figuras 5 y 6). Los índices de depuración de la exendina en las ratas sanas resultó de nuevo similar a los

30 índices de filtración glomerular esperados en dichas ratas (4,2 ml/min). Al tomar en conjunto dichos resultados se observa que se produce muy poco metabolismo sistémico y que la mayor parte de la depuración de la exendina 4 se realiza mediante la filtración en los riñones (pero no mediante la proteólisis intravascular renal). La baja cantidad de exendina completa inmunoreactiva en la orina resultan compatibles con el hecho de haberse escindido gracias a los

35 encimas de ribete en cepillo del túbulo proximal tras la filtración.

#### Ejemplo 4

*La exendina-4 disminuye la secreción del glucagón durante los pinzamientos hiperglucémicos en ratas diabéticas*  
Fatty Zucker

40

La hiperglucemia absoluta o relativa es, con frecuencia, una característica de la diabetes mellitus de tipo 1 y tipo 2, y la supresión de la secreción excesiva de glucagón en dichos trastornos y otros descritos o a los que se hace referencia en la presente memoria constituye una ayuda potencial en un tratamiento que utiliza agentes glucagonostáticos. En el

45 presente Ejemplo, se examinó el efecto de la exendina-4 en la secreción del glucagón en machos de ratas anestesiadas del tipo *Diabetic Fatty Zucker* (ZDF). Al utilizar un protocolo de pinzamiento hiperglucémico hiperinsulinémico, se mantuvieron constantes los factores que tienden a influir en la secreción del glucagón. Se realizó el pinzamiento de la glucosa a ~34 mM 60 minutos antes de empezar la venoclis intravenosa de solución salina (n = 7) o de exendina-4 (0,21 µg + 2,1 µg/ml/h; n = 7). La concentración de glucagón en el plasma se determinó antes de dichas venoclis y

50 resultó similar en ambos grupos (306 ± 30 pM comparado con 252 ± 32 pM respectivamente; n. e.).

La concentración media de glucagón en plasma en las ratas a las que se realizó la venoclis con exendina-4 fue de aproximadamente la mitad de la de las ratas a las que se realizó la venoclis con la solución salina en los

55 60 minutos finales del pinzamiento (165 ± 18 pM comparado con 298 ± 26 pM, respectivamente; P < 0,002). El protocolo de pinzamiento hiperglucémico también permitió la determinación de la sensibilidad de la insulina. El ritmo de la venoclis de glucosa durante el pinzamiento se aumento en un 111 ± 7% en las ratas tratadas con exendina-4 en relación con las ratas de control (P < 0,001). En otros términos, la exendina-4 presentó un efecto glucagonostático en las ratas ZDF en las investigaciones de pinzamiento hiperglucémico, un efecto que resultará de ayuda terapéutica en los humanos diabéticos.

#### Ejemplo 5

*Efectos metabólicos de la exendina-4 en la secreción de glucagón en pacientes con diabetes tipo 2*

65

En el presente Ejemplo se analizaron la toxicidad, la tolerabilidad y la eficacia de la exendina-4 sintética en 8 pacientes masculinos que presentaban diabetes tipo 2, que no utilizaban insulina y que habían abandonado todo tipo de tratamiento antidiabético durante un mínimo de 7 días. Se realizaron inyecciones subcutáneas (SC) a cada paciente

## ES 2 343 072 T3

de placebo (PBO) y de 0,1, 0,2 y 0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de exendina-4 separadas por 48 horas en un estudio de diseño cruzado, de anonimato sencillo, con dosificaciones crecientes, controlado por placebo. Cinco pacientes recibieron también una dosificación de 0,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Las concentraciones plasmáticas de glucosa, de insulina y de glucagón se valoraron en ayunas y como respuesta a la provocación mediante la ingestión de 7 Kcal/kg de Sustacal<sup>®</sup> que se administró al mismo tiempo que se realizó la inyección de exendina-4/PBO. Se analizó el vaciado gástrico determinando las concentraciones séricas de paracetamol tras una dosificación oral de 20 mg/kg de paracetamol líquido administrado con el Sustacal<sup>®</sup>. No se presentaron problemas de toxicidad basándose en la presentación de efectos adversos, ECG y el seguimiento de la toxicidad en el laboratorio. Las dosis de 0,3 y 0,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  provocaron un incremento de las náuseas en función de la dosis; se produjeron vómitos con las dosis superiores.

Las concentraciones plasmáticas de glucosa se redujeron con todas las dosificaciones de exendina-4 en comparación con el PBO a pesar de que las concentraciones de insulina no resultaron significativamente distintas. La media  $\pm$  DT (desviación típica) de los cambios al cabo de ocho horas en el área bajo la curva de glucosa desde los valores iniciales fueron de  $+391 \pm 187$ ,  $-263 \pm 108$ ,  $-247 \pm 64$ ,  $-336 \pm 139$  y  $-328 \pm 70$  mg-h/dl para las dosis de PBO, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. Los cambios al cabo de 3 horas en el glucagón plasmático fueron de  $+128,0 \pm 19,2$ ,  $-5,61 \pm 10,5$ ,  $-29,4 \pm 18,6$ ,  $-40,5 \pm 24,5$  y  $+6,9 \pm 38,6$  pg-h/ml, respectivamente. Se ralentizó el ritmo de vaciado gástrico con todas las dosis y la cantidad media total de paracetamol absorbido durante 6 horas se redujo en un 51%, 50%, 57% y 79% en comparación con el PBO para unas dosis de 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectivamente. En resumen, la inyección SC de exendina-4 a los pacientes no presentó toxicidad, se toleró a dosis  $\leq 0,3 \mu\text{g}/\text{kg}$ , redujo el nivel de glucosa plasmática y glucagón y ralentizó el ritmo del vaciado gástrico. Dichas observaciones soportan la utilización de la exendina en el tratamiento de trastornos que se benefician de niveles reducidos de glucagón y/o de la inhibición del glucagón, comprendiendo la diabetes tipo 1 y tipo 2 pero sin limitarse a la misma.

### 25 Ejemplo 6

#### *Exendina-4 modificada con PEG*

En el caso de la exendina 4, un péptido de 39 aminoácidos con un peso molecular de 4187, las modificaciones que aumenten su tamaño y/o incrementen su naturaleza aniónica disminuirán su capacidad de filtración en los riñones. Debido a que la depuración de la exendina 4 se realiza claramente en los riñones ello aumentará eficazmente su vida media. Otras propiedades de la pegilación (aumento de la vida media plasmática debido a la desaparición de dichos mecanismos de depuración renal y/o celular que puedan existir; reducción de la inmunogenia y capacidad antigénica; incremento de la solubilidad; resistencia a la proteólisis; reducción de la toxicidad (evitar dosis enriquecidas); aumento de la estabilidad térmica y mecánica; aumento de la permeabilidad de la capa mucosa o epitelial; y control selectivo de la función biológica específica) constituyen asimismo ventajas potenciales de la exendina 4 y de los agonistas de la exendina.

En particular, debido a que se han observado farmacologías múltiples (que representan probablemente múltiples subtipos de receptores), se pueden seleccionar distintos espectros de actividades biológicas de la exendina 4 incorporando un grupo PEG en las posiciones adecuadas. Se ha descrito la pérdida o la alteración de la actividad biológica de proteínas pegiladas que se puede deber a la presencia de las propias cadenas de PEG, a la posición particular ocupada por la cadena de PEG o a las condiciones de enlace que presenten un efecto adverso en la proteína.

Las primeras consideraciones en la modificación con PEG en lo que se refiere a la filtración en los riñones de la exendina y de los agonistas de la exendina son el tamaño y la carga. La exendina 4 sin modificar presenta un peso molecular de aproximadamente 4,2 kD y presenta una naturaleza aniónica con una carga neta global de aproximadamente -2 a un pH fisiológico. Se pueden unir a la exendina 4 o a un análogo de la exendina 4 uno, dos o tres unidades de PEG mediante enlace covalente, prefiriéndose una unidad de PEG. El tamaño del PEG puede variar desde un peso molecular de 500 hasta 20.000, preferentemente entre 5.000 y 12.000.

Diversos procedimientos de enlace covalente del PEG aprovechan el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina. La exendina 4 presenta dos lisinas que se pueden modificar mediante el enlace con el PEG. La exploración de una alanina de AC3317 (exendina 4 con Leu<sup>14</sup>, Phe<sup>25</sup>1-28), un análogo reducido de la exendina 4, pusieron de manifiesto las posiciones que son sensibles a la sustitución por alanina. Las dos lisinas de las posiciones 12 y 27 se vieron moderadamente afectadas por dicha sustitución indicando que se tolera la pérdida de la cadena lateral del grupo R específico de la lisina (cadena de metileno más el grupo  $\epsilon$ -amino). En relación con el péptido completo, la exendina 4, las dos posiciones de la lisina resultan adecuadas para el enlace con el PEG (véanse compuestos 1 y 2). Además, en función de la química utilizada para conjugar el PEG, los grupos  $\epsilon$ -amino de dichas posiciones se pueden ocultar, por lo tanto, incrementando la naturaleza aniónica del péptido.

(201) HEGTFTSDLSK (PEG) QMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>

65 (202) HEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLK (PEG) NGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>

## ES 2 343 072 T3

Basándose en los resultados de la exploración de la alanina, otras posiciones en las que resulta posible realizar modificaciones mediante la inserción de un Lys-PEG o equivalente, por ejemplo, son:

- 5           (203)       HK (PEG) EGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- (204)       HGEK (PEG) FTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- 10           (205)       HGEFTFK (PEG) DLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- (206)       HGEFTSDK (PEG) SKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- (207)       HGEFTSDLK (PEG) KQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- 15           (208)       HGEFTSDLSKK (PEG) MEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- (209) \*     HGEFTSDLSKQMEK (PEG) EAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- 20           (210) \*     HGEFTSDLSKQMEEK (PEG) AVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- (211)       HGEFTSDLSKQMEEEEAK (PEG) RLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- (212)       HGEFTSDLSKQMEEEAVRK (PEG) FIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- 25           (213) \*     HGEFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEK (PEG) WLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- (214)       HGEFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEK (PEG) LKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- 30           (215)       HGEFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKK (PEG) GGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>

35 Las tres posiciones indicadas anteriormente con un asterisco (\*), que presentan un ácido glutámico por encima de lo normal se indicaron en relación a la modificación con K(PEG), se pueden modificar asimismo mediante la conjugación con el grupo carboxílico de la cadena lateral del glutámico, E(PEG).

Otro análogo al que se puede añadir el Lys-PEG es el supuesto giro Gly Gly:

- 40           (216)       HGEFTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGK (PEG) GPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>
- (217)       HGEFTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGK (PEG) PSSGAPPPS-NH<sub>2</sub>

45 Las posiciones 29 a 39 de la exendina 4 pueden no resultar críticas en la disminución de la actividad de la glucosa tal como se ha puesto de manifiesto con el AC3177 que presenta una actividad prácticamente equipotente a la de la exendina 4 y cualquiera de ellos, solo o en combinación, se puede sustituir por el K(PEG) o un equivalente.

50 Un experto en la materia comprenderá fácilmente que la presente invención se ajusta bien a la realización de los objetivos y permite alcanzar los propósitos y ventajas mencionados anteriormente, así como los intrínsecos de la misma. Los complejos moleculares y los métodos, los procedimientos, los tratamientos, las moléculas, los compuestos específicos descritos en la presente memoria actualmente representativos de las formas de realización preferidas se encuentran a título de ejemplo y no pretenden significar en modo alguno limitaciones del alcance de la presente invención. Cualquier cambio en la misma u otras utilizaciones que se ocurran a los expertos en la materia que se encuentren comprendidos en la presente invención se encuentran definidos por el alcance de las reivindicaciones.

60 La invención descrita a título ilustrativo en la presente memoria se puede poner adecuadamente en práctica en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se den a conocer específicamente en la presente memoria. Por lo tanto, por ejemplo, en cada caso de la presente memoria cualquiera de los términos "comprende", "consiste esencialmente en" y "consiste en" se puede sustituir con cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han utilizado se emplean como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención alguna al utilizar dichos términos y expresiones de excluir cualquiera de las características equivalentes a las ilustradas o descritas, o partes de las mismas, sino que se reconoce que resultan posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, se ha de comprender que, a pesar de que la presente invención se ha dado a conocer específicamente mediante formas de realización preferidas y características opcionales,

## ES 2 343 072 T3

los expertos en la materia pueden recurrir a modificaciones y variaciones de los conceptos que se dan a conocer en la presente memoria, y que dichas modificaciones y variaciones se considera que se encuentran dentro del alcance de la presente invención tal como se encuentra definida mediante las reivindicaciones adjuntas.

5 La presente invención se ha descrito ampliamente y genéricamente en la presente memoria. Cada una de las especies concretas y agrupaciones subgenéricas que caen dentro de la descripción genérica forman también parte de la presente invención. Ello comprende la descripción genérica de la presente invención con la condición o limitación negativa al eliminar cualquier material que pertenece al género, sin tener en consideración si el material eliminado se enumera específicamente en la presente invención o no.

10

Otras formas de realización se encuentran en las reivindicaciones siguientes.

15

20

25

30

35

40

45

50

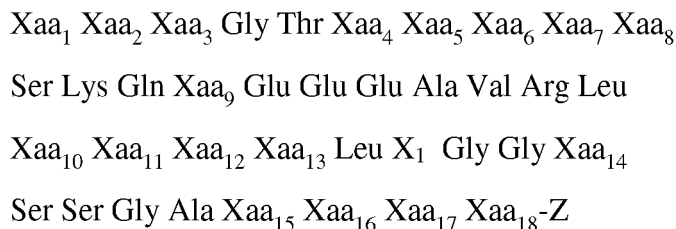
55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto que es una exendina, agonista de la exendina, o exendina modificada o agonista modificado de la exendina para utilizar en la disminución terapéutica del nivel plasmático de glucagón en pacientes diabéticos o intolerantes a la glucosa con unos niveles plasmáticos de glucagón que son superiores a los de las personas sanas, en el que la exendina, agonista de la exendina, o exendina modificada o agonista modificado de la exendina comprende una secuencia de aminoácidos con la fórmula:



en la que,

Xaa<sub>1</sub> es His, Arg, Tyr o 4-imidazolpropionil;

Xaa<sub>2</sub> es Ser, Gly, Ala o Thr;

Xaa<sub>3</sub> es Asp o Glu;

Xaa<sub>4</sub> es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa<sub>5</sub> es Thr o Ser;

Xaa<sub>6</sub> es Ser o Thr;

Xaa<sub>7</sub> es Asp o Glu;

Xaa<sub>8</sub> es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met;

Xaa<sub>9</sub> es Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met;

Xaa<sub>10</sub> es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa<sub>11</sub> es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met;

Xaa<sub>12</sub> es Glu o Asp;

Xaa<sub>13</sub> es Trp, Phe, Tyr, o naftilalanina;

X<sub>1</sub> es Lys Asn, Asn Lys, Lys-NH<sup>ε</sup>-R Asn, Asn Lys-NH<sup>ε</sup>-R, en la que R es Lys, Arg, una cadena alcanoílo o cicloalquilalcanoílo lineal o ramificada C<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>;

Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub> son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alkilglicina, N-alkilpentilglicina o N-alkilalanina;

Xaa<sub>18</sub> es Ser, Thr o Tyr

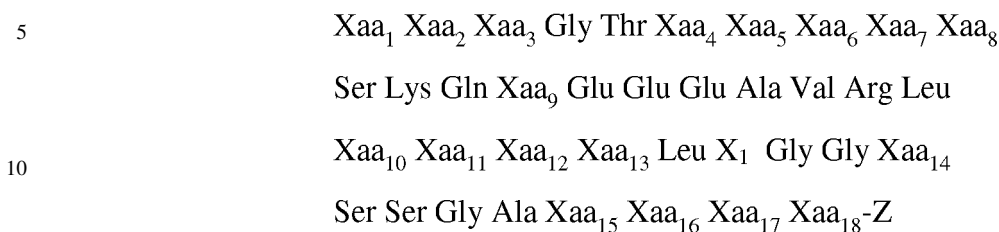
y Z es -OH o -NH<sub>2</sub>;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, siempre que la secuencia de aminoácidos no presente la fórmula de las SEC ID n.º 1 ni n.º 2.

2. Compuesto para utilizar según la reivindicación 1, en el que Xaa<sub>4</sub> y Xaa<sub>10</sub> se seleccionan independientemente de entre Phe o naftilalanina; Xaa<sub>11</sub> es Ile o Val; y Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub> se seleccionan independientemente de entre Pro, homoprolina, tioprolina o N-alkilalanina.

## ES 2 343 072 T3

3. Compuesto para utilizar según la reivindicación 1, que comprende un aminoácido de fórmula:



15 en la que;

Xaa<sub>1</sub> es His, Arg o Tyr;

20 Xaa<sub>2</sub> es Ser, Gly, Ala o Thr;

Xaa<sub>3</sub> es Asp o Glu;

Xaa<sub>4</sub> es Phe, Tyr o naftilalanina;

25 Xaa<sub>5</sub> es Thr o Ser;

Xaa<sub>6</sub> es Ser o Thr;

30 Xaa<sub>7</sub> es Asp o Glu;

Xaa<sub>8</sub> es Leu, Ile, Val, pentilglicina o Met;

Xaa<sub>9</sub> es Leu, Ile, pentilglicina, Val o Met;

35 Xaa<sub>10</sub> es Phe, Tyr o naftilalanina;

Xaa<sub>11</sub> es Ile, Val, Leu, pentilglicina, terc-butilglicina o Met;

40 Xaa<sub>12</sub> es Glu o Asp;

Xaa<sub>13</sub> es Trp, Phe, Tyr o naftilalanina;

45 Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub> son independientemente Pro, homoprolina, 3Hyp, 4Hyp, tioprolina, N-alquilglicina, N-alquilentilglicina o N-alquilalanina;

Xaa<sub>18</sub> es Ser, Thr o Tyr; y

Z es -OH o -NH<sub>2</sub>;

50 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, con la condición de que el compuesto no presente la fórmula de las SEC. ID. n.º 1 o 2.

55 4. Compuesto para utilizar según la reivindicación 3, en el que Xaa<sub>1</sub> es His; Xaa<sub>2</sub> es Gly; Xaa<sub>4</sub> es Phe o naftilalanina; Xaa<sub>9</sub> es Leu, pentilglicina o Met; Xaa<sub>10</sub> es Phe o naftilalanina; Xaa<sub>11</sub> es Ile o Val; Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub> y Xaa<sub>17</sub> se seleccionan independientemente de entre Pro, homoprolina, tioprolina o N-alquilalanina; y Xaa<sub>18</sub> es Ser.

60 5. Compuesto que es una exendina, agonista de la exendina, o exendina modificada o agonista modificado de la exendina para utilizar en la disminución terapéutica del nivel plasmático de glucagón en pacientes diabéticos o intolerantes a la glucosa con unos niveles plasmáticos de glucagón que son superiores a los de las personas sanas, en el que la exendina, agonista de la exendina, o exendina modificada o agonista modificado de la exendina comprende una secuencia de aminoácidos con la fórmula:

65



## ES 2 343 072 T3

Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Gly Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Xaa<sub>7</sub> Xaa<sub>8</sub> Xaa<sub>9</sub> Xaa<sub>10</sub>  
Xaa<sub>11</sub> Xaa<sub>12</sub> Xaa<sub>13</sub> Xaa<sub>14</sub> Xaa<sub>15</sub> Xaa<sub>16</sub> Xaa<sub>17</sub> Ala Xaa<sub>19</sub>  
5 Xaa<sub>20</sub> Xaa<sub>21</sub> Xaa<sub>22</sub> Xaa<sub>23</sub> Xaa<sub>24</sub> Xaa<sub>25</sub> Xaa<sub>26</sub> Xaa<sub>27</sub> Xaa<sub>28</sub>-Z<sub>1</sub>;

en la que

10

Xaa<sub>1</sub> es His o Arg;

Xaa<sub>2</sub> es Gly o Ala;

15

Xaa<sub>3</sub> es Asp o Glu;

Xaa<sub>5</sub> es Ala o Thr;

Xaa<sub>6</sub> es Ala, Phe o naftilalanina;

20

Xaa<sub>7</sub> es Thr o Ser;

Xaa<sub>8</sub> es Ala, Ser o Thr;

25

Xaa<sub>9</sub> es Asp o Glu;

Xaa<sub>10</sub> es Ala, Leu o pentilglicina;

Xaa<sub>11</sub>, es Ala o Ser;

30

Xaa<sub>12</sub> es Ala o Lys;

Xaa<sub>13</sub> es Ala o Gln;

35

Xaa<sub>14</sub> es Ala, Leu o pentilglicina;

Xaa<sub>15</sub> es Ala o Glu;

Xaa<sub>16</sub> es Ala o Glu;

40

Xaa<sub>17</sub> es Ala o Glu;

Xaa<sub>19</sub> es Ala o Val;

45

Xaa<sub>20</sub> es Ala o Arg;

Xaa<sub>21</sub> es Ala o Leu;

Xaa<sub>22</sub> es Phe o naftilalanina;

50

Xaa<sub>23</sub> es Ile, Val o terc-butilglicina;

Xaa<sub>24</sub> es Ala, Glu o Asp;

55

Xaa<sub>25</sub> es Ala, Trp o Phe;

Xaa<sub>26</sub> es Ala o Leu;

Xaa<sub>27</sub> es Ala o Lys;

60

Xaa<sub>28</sub> es Ala o Asn;

65

## ES 2 343 072 T3

Z<sub>1</sub> es

Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala-Z<sub>2</sub>,

Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>36</sub>-Z<sub>2</sub>,

Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>36</sub> Xaa<sub>37</sub>-Z<sub>2</sub>,

Gly Gly Xaa<sub>31</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>36</sub> Xaa<sub>37</sub> Xaa<sub>38</sub>-Z<sub>2</sub>;

en la que Xaa<sub>31</sub>, Xaa<sub>36</sub>, Xaa<sub>37</sub>, y Xaa<sub>38</sub> son independientemente Pro, homoprolina, tioprolina o N-metilalanina; y

Z<sub>2</sub> es -OH o -NH<sub>2</sub>

con la condición de que no más de tres entre, Xaa<sub>3</sub>, Xaa<sub>5</sub>, Xaa<sub>6</sub>, Xaa<sub>8</sub>, Xaa<sub>9</sub>, Xaa<sub>10</sub>, Xaa<sub>11</sub>, Xaa<sub>12</sub>, Xaa<sub>13</sub>, Xaa<sub>14</sub>, Xaa<sub>15</sub>, Xaa<sub>16</sub>, Xaa<sub>17</sub>, Xaa<sub>19</sub>, Xaa<sub>20</sub>, Xaa<sub>21</sub>, Xaa<sub>24</sub>, Xaa<sub>25</sub>, Xaa<sub>26</sub>, Xaa<sub>27</sub> y Xaa<sub>28</sub> sean Ala; y una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

6. Compuesto que es una exendina, agonista de la exendina, o exendina modificada o agonista modificado de la exendina para utilizar en la disminución terapéutica del nivel plasmático de glucagón en pacientes diabéticos o intolerantes a la glucosa con unos niveles plasmáticos de glucagón que son superiores a los de las personas sanas, comprendiendo el compuesto la secuencia de aminoácidos de la exendina-3 o la exendina-4.

7. Compuesto para utilizar según la reivindicación 6, que comprende la secuencia de aminoácidos de la exendina-4.

8. Compuesto para utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la exendina modificada o el agonista modificado de la exendina se enlaza con uno o más polímeros de macrogol.

9. Compuesto para utilizar según la reivindicación 8, en la que el polímero de macrogol presenta un peso molecular comprendido entre 500 y 20.000.

10. Compuesto para utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el paciente es un ser humano.

11. Compuesto para utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el paciente diabético presenta diabetes de tipo 1.

12. Compuesto para utilizar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el paciente diabético presenta diabetes de tipo 2.

13. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en la realización de un medicamento para utilizar en la disminución terapéutica del nivel plasmático de glucagón en pacientes diabéticos o intolerantes a la glucosa con unos niveles plasmáticos de glucagón que son superiores a los de las personas sanas.

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1           5           10           15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20           25           30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Ser-NH<sub>2</sub>  
 35

**Fig. 1**

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 5           10           15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20           25           30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Ser-NH<sub>2</sub>  
 35

**Fig. 2**

1 Xaa<sub>1</sub> Xaa<sub>2</sub> Xaa<sub>3</sub> Gly Thr Xaa<sub>4</sub> Xaa<sub>5</sub> Xaa<sub>6</sub> Xaa<sub>7</sub> Xaa<sub>8</sub> Ser Lys Gln Xaa<sub>9</sub> Glu Glu Ala Val Arg Leu 20  
 5 10 15 20  
 Xaa<sub>10</sub> Xaa<sub>11</sub> Xaa<sub>12</sub> Xaa<sub>13</sub> Leu Lys Asn Gly Gly Xaa<sub>14</sub> Ser Ser Gly Ala Xaa<sub>15</sub> Xaa<sub>16</sub> Xaa<sub>17</sub> Xaa<sub>18</sub> -Z 35

Compuasio [SEC. ID. n°]	Xaa <sub>1</sub>	Xaa <sub>2</sub>	Xaa <sub>3</sub>	Xaa <sub>4</sub>	Xaa <sub>5</sub>	Xaa <sub>6</sub>	Xaa <sub>7</sub>	Xaa <sub>8</sub>	Xaa <sub>9</sub>	Xaa <sub>10</sub>	Xaa <sub>11</sub>	Xaa <sub>12</sub>	Xaa <sub>13</sub>	Xaa <sub>14</sub>	Xaa <sub>15</sub>	Xaa <sub>16</sub>	Xaa <sub>17</sub>	Xaa <sub>18</sub>	Z
1 [10]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
2 [11]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
3 [12]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
4 [13]	Tyr	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
5 [14]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Tyr	Ser	NH <sub>2</sub>
6 [15]	His	Gly	Asp	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
7 [16]	His	Gly	Glu	naph	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
8 [17]	His	Gly	Glu	Phe	Ser	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
9 [18]	His	Gly	Glu	Phe	Ser	Thr	Asp	Leu	Met	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
10 [19]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Thr	Asp	Leu	Met	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
11 [20]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Glu	Leu	Met	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
12 [21]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	pGly	Met	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
13 [22]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	pGly	Leu	Phe	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
14 [23]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	pGly	Phe	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
15 [24]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	pGly	Phe	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
16 [25]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	naph	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
17 [26]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Val	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>

Fig. 3A

Compuesto [SEC. ID. n°]	Xaa <sub>1</sub>	Xaa <sub>2</sub>	Xaa <sub>3</sub>	Xaa <sub>4</sub>	Xaa <sub>5</sub>	Xaa <sub>6</sub>	Xaa <sub>7</sub>	Xaa <sub>8</sub>	Xaa <sub>9</sub>	Xaa <sub>10</sub>	Xaa <sub>11</sub>	Xaa <sub>12</sub>	Xaa <sub>13</sub>	Xaa <sub>14</sub>	Xaa <sub>15</sub>	Xaa <sub>16</sub>	Xaa <sub>17</sub>	Xaa <sub>18</sub>	Z
18 [27]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Val	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
19 [28]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	tBuG	Glu	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
20 [29]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	tBuG	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
21 [30]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Asp	Trp	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
22 [31]	His	Ala	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	NH <sub>2</sub>
23 [32]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	tPro	tPro	tPro	tPro	Ser	NH <sub>2</sub>
24 [33]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	tPro	tPro	tPro	Ser	NH <sub>2</sub>
25 [34]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	hPro	hPro	hPro	hPro	Ser	NH <sub>2</sub>
26 [35]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	hPro	hPro	hPro	Ser	NH <sub>2</sub>
27 [36]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	tPro	tPro	tPro	tPro	Ser	NH <sub>2</sub>
28 [37]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	hPro	hPro	hPro	hPro	Ser	NH <sub>2</sub>
29 [38]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	MeAla	MeAla	MeAla	MeAla	Ser	NH <sub>2</sub>
30 [39]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Met	Phe	Ile	Glu	Trp	Pro	MeAla	MeAla	MeAla	Ser	NH <sub>2</sub>
31 [40]	His	Gly	Glu	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	MeAla	MeAla	MeAla	MeAla	Ser	NH <sub>2</sub>

Fig. 3B

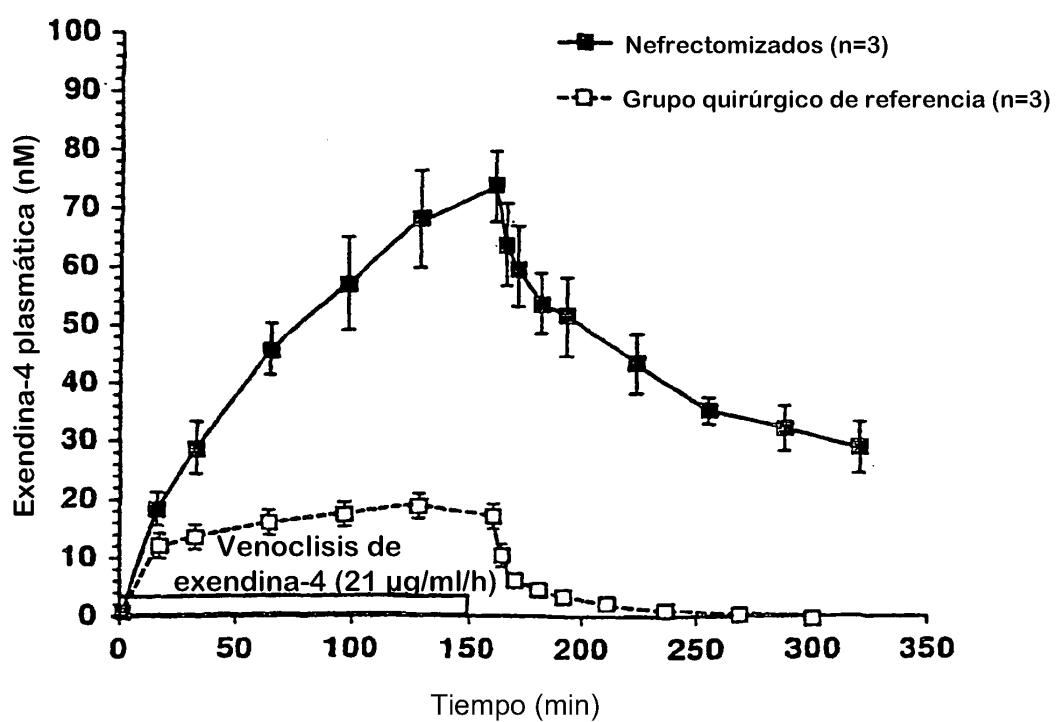
Posición del aminoácido	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Compuesto 1	His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu	Glu	Ala	Val	Arg
Compuesto 2	His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu	Glu	Ala	Val	Arg
Compuesto 3	His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu	Glu	Ala	Val	Arg
Compuesto 4	His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln	Leu	Glu	Glu	Glu	Ala	Val	Arg

**Fig. 4 A1**

Posición del Aminoácido	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
Compuesto 1	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	NH2
Compuesto 2	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	NH2	
Compuesto 3	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser	Ser	Gly	Ala	Pro	NH2		
Compuesto 4	Leu	Phe	Ile	Glu	Phe	Leu	Lys	Asn	Gly	Gly	Pro	Ser	Ser	Gly	Ala	NH2			

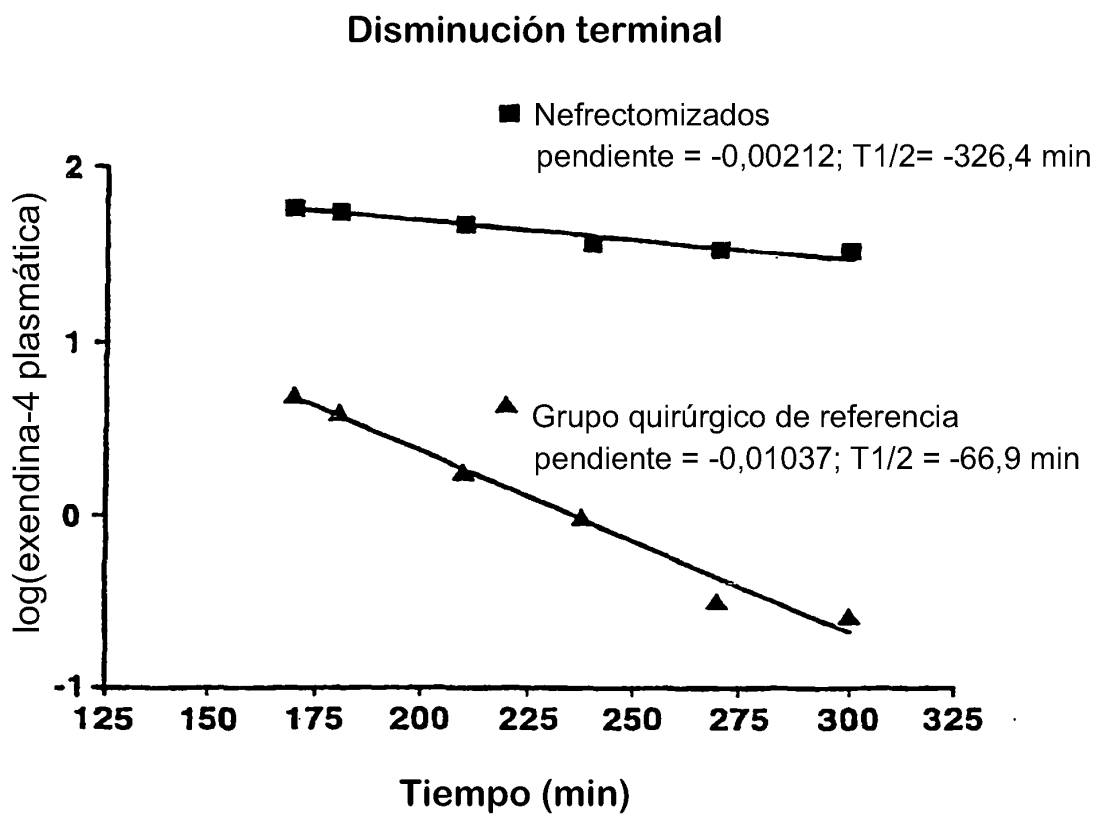
**Fig. 4 A2**

Efecto de la nefrectomía funcional en la depuración de la exendina-4



**Fig. 5**





**Fig. 6**