

(11) Número de Publicação: **PT 1326630 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 38/26 (2007.10) **A61P 19/00** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2001.09.17**

(30) Prioridade(s): **2000.09.18 GB 0022844**
2000.12.07 GB 0029920

(43) Data de publicação do pedido: **2003.07.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.05.28**
171/2008

(73) Titular(es):

SANOS BIOSCIENCE A/S
HERLEV HOVEDGADE 207 2730 HERLEV **DK**

(72) Inventor(es):

DENNIS BANG HENRIKSEN **DK**
JENS JUUL HOLST **DK**

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE PÉPTIDOS GLP-2**

(57) Resumo:

RESUMO

"Utilização de péptidos GLP-2"

Propõe-se péptido semelhante a glucagon-1 (GLP-1) e/ou péptido semelhante a glucagon-2 (GLP-2) ou um seu análogo ou derivado, para utilização na inibição da reabsorção óssea ou para promoção da formação óssea.

DESCRIÇÃO

"Utilização de péptidos GLP-2"

CAMPO DO INVENTO

Este invento refere-se à utilização do péptido semelhante a glucagon-2 (GLP-2) e de análogos e derivados de GLP-2, no fabrico de medicamentos para o tratamento de perda de massa óssea através da inibição da reabsorção óssea. Tais composições podem ser utilizadas no tratamento de doenças em que a reabsorção óssea e/ou a insuficiente formação óssea seja um factor, tal como a osteoporose.

ANTECEDENTES DO INVENTO

O péptido semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) e o péptido semelhante ao glucagon-2 (GLP-2) são fragmentos da molécula de proglucagon e a molécula de proglucagon tem uma sequência de 160 aminoácidos. O proglucagon origina-se a partir do preproglucagon que é sintetizado nas células L no íleo distal, no pâncreas e no cérebro. O processamento do proglucagon para dar GLP-1 e GLP-2 ocorre principalmente nas células L.

Sabe-se que o péptido semelhante a glucagon-1 (GLP-1) estimula a secreção de insulina e inibe a secreção de glucagon e deste modo baixa a glicose no sangue, Andreasen, J.J. et al. (*Digestion* 55: 221-228, 1994). Geralmente, sabe-se que as várias formas divulgadas de GLP-1 estimulam a secreção de insulina e a formação de AMPc (ver, p. ex., Mojsov, S. (*Int. J. Peptide Protein Research* 40: 333-343, 1992)).

O péptido semelhante a glucagon-2 (GLP-2) é um fragmento peptídico de 33 aminoácidos de proglucagon correspondente à sequência do fragmento 126-158 de proglucagon. GLP-2 mostra uma homologia notável em termos de sequência de aminoácidos com o glucagon e o péptido semelhante a glucagon-1 (GLP-1). Mais, as diferentes formas de GLP-2 de mamífero são altamente conservadas. Por exemplo, o GLP-2 humano e o GLP-2 de degu (um roedor sul americano) diferem do GLP-2 de rato (rGLP-2) em um e três aminoácidos, respectivamente.

Várias formas de GLP-2 de vertebrado foram relatadas por muitos autores incluindo Buhl *et al.*, *J. Biol. Chem.* 263(18): 8621, 1988, Nishi e Steiner, *Mol. Endocrinol.* 4: 1192-8, 1990 e Irwin e Wong, *Mol. Endocrinol.* 9(3): 267-77, 1995.

Quando dado exogenamente, GLP-2 pode produzir um marcado aumento na proliferação do epitélio do intestino delgado dos ratinhos de teste, aparentemente sem efeitos secundários indesejáveis (Drucker *et al.*, *PNAS USA* 93: 7911-7916, 1996, WO 98/52600). Além disso, mostrou-se também que GLP-2 aumenta a velocidade de transporte máxima da D-glicose através da membrana intestinal basolateral (Cheeseman e Tseng, *American Journal of Physiology* 271: G477-G482, 1996).

A osteoporose é a doença óssea mais comum nos seres humanos. É uma doença grave e frequente, que ocorre em todo o mundo. O principal factor de risco para a osteoporose é a deficiência de estrogénio e estima-se que até um terço das mulheres na pós-menopausa serão afectadas se deixadas sem tratamento, Schlemmer, A. *et al.*, *Eur. J. Endocrinol.* 140: 332-337, 1999. Um acontecimento primário que conduz à perda óssea osteoporótica é o aumento na renovação óssea associado à menopausa. O aumento agudo na reabsorção óssea observado com o declínio na produção de estrogénio endógeno é seguido de um aumento associado, mas menos acentuado na formação óssea. Este desequilíbrio líquido entre a reabsorção e a formação resulta em perda óssea aumentando deste modo o risco de fracturas.

Outras doenças e distúrbios metabólicos que resultam na perda de estrutura óssea são por exemplo, hiperparatiroidismo, doença de Paget, hipercalcemia de malignidade, lesões osteolíticas produzidas por metástases ósseas, perda óssea devido a imobilização ou deficiência de hormonas sexuais e osteomalacia.

Surpreendentemente, foi agora descoberto que o péptido GLP-2 administrado tem um efeito de perda da massa óssea em seres humanos. Com base nestas observações é agora possível proporcionar um medicamento e um método para o tratamento, incluindo o tratamento profilático, contra a perda de massa óssea em doenças ou distúrbios tais como osteoporose, em que a

reabsorção óssea e/ou a insuficiente formação óssea é um factor.

SUMÁRIO DO INVENTO

Num aspecto, o presente invento refere-se à utilização de um péptido semelhante a glucagon-2 (GLP-2) ou de um análogo deste em que, na sequência de aminoácidos de GLP-2, um ou mais aminoácidos foram suprimidos ou um ou mais aminoácidos foram adicionados, ou um ou mais aminoácidos foram substituídos por porções estruturalmente semelhantes imitadoras de aminoácidos mas resistentes a peptidases, ao mesmo tempo que se mantém a capacidade do referido análogo para se ligar a um receptor de GLP-2 e para activar o referido receptor para proporcionar o mensageiro resultante do receptor ou sinal, ou de um sal de adição ácida de um GLP-2, um éster C₁-C₃ de um GLP-2 ou uma amida C₁-C₃ de um GLP-2, no fabrico de um medicamento para o tratamento de perda de massa óssea através da inibição da reabsorção óssea.

No presente texto, a designação "um análogo" é utilizada para designar um péptido em que um ou mais resíduos de aminoácidos do péptido original foram substituídos por outro resíduo de aminoácido e/ou em que um ou mais resíduos de aminoácidos do péptido original foram suprimidos e/ou em que um ou mais resíduos de aminoácidos foram adicionados ao péptido original.

O termo "análogo" inclui ainda imitadores dos referidos péptidos que se ligam aos receptores dos referidos péptidos e activam o referido receptor para produzir um mensageiro ou sinal resultante de tipo equivalente ao produzido após a ligação de GLP-2. Tais análogos podem ser adaptados para resistir a degradação no corpo a uma extensão superior à de GLP-2 e podem assim ter uma maior semivida ou podem ser administráveis oralmente. Tais análogos incluirão pseudopéptidos baseados em GLP-2 em que um ou mais resíduos de aminoácidos foram substituídos com porções imitadoras de aminoácidos estruturalmente semelhantes mas resistentes a peptidases.

No presente texto, a designação "resíduo de aminoácido" designa o resíduo de um aminoácido que pode ser codificado pelo código genético, através de um tripleto ("codão") de nucleótidos. No presente texto, os péptidos aos quais o presente invento se refere são referidos colectivamente como "péptidos GLP-2".

Os "derivados" aqui referidos incluem por exemplo, sais de adição ácida, sais de carboxilato, alquilos inferiores (p. ex., C₁-C₆, de preferência C₁-C₃), ésteres e amidas. Estão também incluídas substâncias formadas através de modificação química do péptido GLP-2 que mantêm as propriedades de diminuição da reabsorção óssea e/ou aumento da formação óssea de GLP-2 a um nível equivalente ou aumentado.

De preferência, a doença a tratar na utilização de medicamentos feitos de acordo com o presente invento é a osteoporose.

Noutra concretização preferida, o medicamento feito de acordo com o presente invento é administrado oralmente.

As composições aqui descritas podem ser utilizadas num método de tratamento profilático da perda de massa óssea num sujeito em risco de desenvolver uma doença em que a reabsorção óssea e/ou a insuficiente formação óssea seja um factor, compreendendo o método os passos de a) identificação de um sujeito em risco de desenvolver uma tal doença (que pode ser osteoporose); e b) administração a um sujeito de uma quantidade de um medicamento de péptido GLP-2 feito de acordo com o presente invento eficaz a inibir a reabsorção óssea.

O sujeito é de preferência um ser humano.

O GLP-2 pode ser estabilizado contra a degradação no corpo através de modificação química tal como descrito em WO 02/10195.

O composto activo utilizado no fabrico de um medicamento de acordo com o presente invento pode ser um análogo ou derivado oralmente eficaz.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

O presente invento é ainda ilustrado com referência aos desenhos anexos em que:

A Fig. 1 mostra nos gráficos A, B e C os resultados obtidos nos Estudos Antecedentes 1-3. A Fig. 1A mostra os níveis de GLP-1, GIP e S-CTX ao longo de um período de 2-3 horas respondendo a frutose oral. GIP (Polipéptido Glicose-dependente Insulinotrópico) é uma incretina que estimula a secreção de insulina directamente de um modo dependente da glicose. S-CTX é um fragmento C-telopeptídico do soro da degradação do colagénio de tipo I. A Fig. 1B mostra os níveis de GLP-1, GIP e S-CTX ao longo de um período de 2-3 horas respondendo ao ácido gordo de cadeia longa (AGCL) oral e a Fig. 1C mostra os níveis de GLP-2, GIP e S-CTX ao longo de um período de 2-3 horas respondendo a proteína oral.

A Fig. 2 mostra os resultados obtidos no Estudo Antecedente 4. A Figura mostra os níveis de S-CTX, GLP-1 e GLP-2 em pacientes com intestino curto mas com cólon conservado ao longo de um período de 3 horas respondendo a uma refeição normal.

A Fig. 3 mostra os resultados obtidos no Exemplo 1. A Figura mostra os níveis de S-CTX e GLP-2_{intacto} ao longo de um período de 7 horas respondendo a uma injecção de GLP-2.

DESCRÍÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Este invento comprehende a utilização do péptido semelhante a glucagon-2 (GLP-2) e de análogos e derivados de GLP-2, no fabrico de um medicamento para o tratamento de perda de massa óssea através da inibição da reabsorção óssea, útil no tratamento de doenças em que a reabsorção óssea e/ou a insuficiente formação óssea é um factor, tal como em osteoporose.

As doenças e os distúrbios metabólicos que resultam em perda da estrutura óssea beneficiariam de um tal tratamento. Por exemplo, hiperparatiroidismo, doença de Paget, hipercalcemia de malignidade, lesões osteolíticas produzidas

por metástases ósseas, perda óssea devido a imobilização ou deficiência em hormonas sexuais, e osteomalacia.

É bem conhecida a utilização de marcadores bioquímicos para ser capaz de avaliar bioquimicamente o nível de reabsorção e formação óssea para avaliar o risco de uma futura fractura. No entanto, existe uma considerável variação circadiana com um pico no início da manhã e o nível inferior à tarde. Isto é habitualmente tido em conta através de jejum durante a medição.

Esta variação é independente do género, da idade e do estádio de osteoporose embora seja observado um nível limiar elevado em mulheres pós-menopausa. É também dependente da actividade física, assim 3 dias de repouso na cama não alteram a variação em mulheres pós-menopausa.

Foi estudada a variação circadiana do cortisol plasmático como possível factor. Nem indivíduos insuficientes em cortisol substituídos intermitentemente com cortisol para eliminar a variação circadiana nem os estudos de fixação do cortisol em mulheres saudáveis pós-menopausa demonstraram qualquer insuficiência na variação circadiana na reabsorção óssea. Os estudos de fixação de PTH em mulheres pré- e pós-menopausa tinham mostrado que a variação circadiana na renovação óssea é também independente da concentração sérica de PTH. Recentemente um estudo em mulheres pré-menopausa demonstrou que a variação circadiana na reabsorção óssea medida através da excreção urinária de fragmentos C-telopeptídicos da degradação do colagénio de tipo 1 foi significativamente diminuída durante o jejum, Schlemmer, A. et al., *Eur. J. Endocrinol.* 140: 332-337, 1999.

Os mecanismos bioquímicos subjacentes à variação circadiana na reabsorção óssea permanecem pouco compreendidos.

Foi observada uma associação entre os níveis de insulina após glicose OGTT/oral e a massa óssea em mulheres saudáveis, pós-menopausa, Reid I.R. et al., "The American Physiological Society" E655-E659, 1993. Para além disso, os dados limiares do Estudo de Roterdão demonstraram que esta associação estava presente tanto em homens como em mulheres idosos, mas era

reduzida após a correção para BMI, Stolk, R.P. et al., *Bone* 6: 545-549, 1996. Nesta coorte, a fractura não vertebral prévia estava associada a um nível de insulina pós-carga inferior. Os dados iniciais do seguimento do estudo sugerem que os níveis limiares de insulina pós-carga corrigidos para BMI e a massa óssea estão associados a um risco reduzido de fracturas não vertebrais incidentes, Hendrikse, J. et al., "ASBMR-IBMS Second Joint Meeting" S501. Finalmente, os dados de glicose OGTT/oral em 19000 homens e mulheres suecos ("Swedish") sem diabetes conhecidos sugerem que uma S-glicose elevada pós-carga em indivíduos não diabéticos está associada a um risco menor de fractura da anca, Johnell, O. et al., "ASBMR-IBMS Second Joint Meeting S170". Assim, parece haver uma associação entre a resposta à insulina e a massa óssea bem como um subsequente risco de fractura. Esta associação pode ser parcialmente explicada por uma influência da insulina após reabsorção óssea. A possibilidade de uma tal relação é suportada pela recente demonstração de receptores de insulina em células semelhantes a osteoclastos, Thomas, D.M. et al., *Bone* 23: 181-186, 1993 e em osteoblastos, Thomas, D.M. et al., *J. Bone Miner. Res.* 11: 1312-1320, 1996.

O esqueleto é (entre outras coisas) um reservatório de nutrientes, incluindo minerais tais como cálcio e fosfato. Este reservatório está habitualmente bem protegido mas em situações de insuficiente acesso a nutrientes que dê origem a uma diminuição da concentração extracelular destes nutrientes as reservas destes no esqueleto podem ser mobilizadas. Do mesmo modo, em situações de acesso suficiente a nutrientes a maquinaria metabólica do corpo está regulada para conservar as reservas.

Para o esqueleto uma tal mobilização das reservas pode ser alcançada através da estimulação da reabsorção óssea osteoclástica e do mesmo modo a reabsorção pode ser diminuída quando aumenta a disponibilidade dietética de nutrientes.

Tal regulação do metabolismo ósseo foi anteriormente demonstrada para a toma dietética de cálcio. Observámos recentemente que a glicose oral pode também diminuir a reabsorção óssea, com uma diminuição completamente expressa em 2 horas.

Esta resposta é independente do género e da idade. Um efeito comparável foi demonstrado para proteína. Assim, a toma dietética pode regular a reabsorção óssea, parcialmente através da secreção de insulina tal como mostrado através do teste de estimulação com insulina.

A toma oral de nutrientes produz uma queda de curto prazo na velocidade de reabsorção óssea. Para além disso, a administração de insulina num teste de tolerância à insulina (TTI) produz uma queda de curto prazo semelhante na velocidade medida de reabsorção óssea.

O nutriente que pode inibir a reabsorção óssea pode ser um açúcar, uma proteína ou um ácido gordo, p. ex. um ácido gordo de cadeia longa, ou um triglicérido ou um mineral.

Foi mostrado e descrito que os fármacos no mercado para tratamento de osteoporose têm efeitos secundários indesejados. É concluído por Graham, D.Y. et al., *Aliment. Pharmacol. Ther.* 4: 515-9, 1999 que o alendronato (Fosamax) causa ulceração gástrica. Para além disso, é afirmado que a utilização vulgar de terapia de substituição hormonal (TSH) aumenta o risco de cancro da mama, Persson, I. et al., *Int. J. Cancer* 72(5): 75825 61, 1997.

Por essa razão, existe a necessidade de um medicamento para o tratamento de doenças em que a reabsorção óssea e/ou a insuficiente formação óssea é um factor, tal como a osteoporose, que não mostre os efeitos secundários indesejados acima mencionados.

De acordo com o presente invento, foi agora surpreendentemente mostrado que os fragmentos GLP-2 de proglucagon produzidos no intestino têm um papel na inibição da reabsorção óssea.

O proglucagon expresso nas células α do pâncreas endócrino e nas células L enteroendócrinas do intestino surge da transcrição de um único gene e da tradução de ARNm idênticos nestes dois tecidos. A diversidade biológica na expressão do gene de proglucagon ocorre ao nível de um processamento pós-tradução alternativo notavelmente específico

do tecido, resultando na formação do péptido bioactivo glucagon no pâncreas e no GLP-1 recíproco de estimulação por insulina no intestino.

As sequências de glucagon e de GLP no intestino e no pâncreas, respectivamente, são mantidas como fragmentos de proglucagon não processados: enteroglucagon (glicentina) no intestino e o fragmento principal de proglucagon no pâncreas, Habener, J.F., *Diabetes Mellitus* 68-78, 1996.

A glicentina ou o fragmento de proglucagon 1-69 é clivado no pâncreas em GRPP (polipéptido pancreático relacionado com glicentina) e glucagon, enquanto o principal fragmento de proglucagon 72-158 é clivado (processado) no intestino em fragmentos GLP-1 (fragmento de proglucagon 78-107) e GLP-2 (fragmento de proglucagon 126-158).

É notável que o processamento alternativo de proglucagon idêntico no intestino e no pâncreas dê origem a péptidos cujas funções fisiológicas sejam opostas. O GLP-1 do intestino é uma hormona anabólica que entre outras coisas facilita a estimulação da secreção de insulina e a tomada de glicose durante a alimentação, enquanto o glucagon do pâncreas é a hormona catabólica mais importante que actua durante períodos de jejum quebrando o glicogénio (e aumentando deste modo a saída de glicose do fígado, músculo-esquelético e tecido adiposo).

A clivagem proteolítica do proglucagon no intestino faz parte de um processo complicado. Resultam do processamento pelo menos quatro péptidos de GLP-1: dois péptidos de 37 e 36 aminoácidos, GLP-1 (1-37) e amida de GLP-1 (1-36); e dois isopéptidos truncados no terminal amino, GLP-1 (7-37) e amida de GLP-1 (7-36). Apenas os dois GLP-1 truncados têm actividades insulinotrópicas. Não se verificaram actividades biológicas em nenhuma das formas amino-terminalmente prolongadas de GLP-1. Ambos os isopéptidos de GLP-1, GLP-1 (7-37) e amida de GLP-1 (7-36), têm potências insulinotrópicas em todos os sistemas nos quais foram estudados até agora, incluindo seres humanos, Habener, J.F., *Diabetes Mellitus* 68-78, 1996. Em seres humanos o produto predominante é amida de GLP-1 (7-36), e é produzido muito pouco das outras formas.

Provou-se que GLP-1 é um potente péptido insulinotrópico dependente de glicose distinto de GIP. GIP (Polipéptido Inibidor Gástrico que foi mudado para Polipéptido Insulinotrópico Glicose-dependente), é uma incretina que estimula a secreção de insulina directamente de um modo dependente da glicose.

A sequência de aminoácidos de GIP foi determinada em 1981 por Jornvall *et al.*, *FEBS Lett.* 123: 205, 1981. A combinação das duas hormonas GIP e GLP-1, no entanto, parece constituir a maioria se não todos os componentes do efeito de incretina, Nauck, M.A. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76 (4): 912-917, 1993.

O processamento intestinal do proglucagon dá também origem a GLP-2 correspondendo a proglucagon 126-158. Em seres humanos é conhecida apenas uma única forma, Hartmann B. *et al.*, *Peptides* 21(1): 73-80, 2000.

GLP-2 parece partilhar o efeito de GLP-1 na mobilidade e secreção gastrointestinal, Wojdemann, M. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84(7): 2513-2517, 1999 e Wo demann, M. *et al.*, *Scand. J. Gastroenterol.* 33(8): 828-832, 1998, mas não tem um efeito directo nos ilhéus pancreáticos. Em contraste GLP-2 tem efeito trófico na mucosa intestinal e pode actuar fisiologicamente como factor de crescimento envolvido em respostas adaptativas dos intestinos a cirurgia ou a variação nutricional, Drucker, D.J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(15): 7911-7916, 1996 e Thulesen, J. *et al.*, *Gut*, No prelo. Inibe a apoptose e causa proliferação epitelial no intestino delgado, Tsai, C.H. *et al.*, *Am. J. Physiol.* 273(1 Pt 1): E77-E84, 1997, e pode ser utilizado clinicamente para tratar pacientes com o síndroma do intestino curto, Jeppesen, P.B. *et al.*, *Gastroenterology*, No prelo. Actua através de uma proteína G acoplada ao receptor que é expressa em várias regiões do corpo, particularmente na mucosa intestinal, Munroe, D.G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(4): 1569-1573, 1999.

Tal como aqui se utiliza o termo "agonista do receptor de GLP-2" significa qualquer molécula que após ligação ao receptor de GLP-2 resulta na activação do receptor de GLP-2 e inclui por exemplo GLP-2 ou análogos peptídicos de GLP-2.

Recentemente foi demonstrado que o receptor de GLP-2 é um receptor acoplado à proteína G. Assim, os métodos vulgarmente utilizados neste campo para identificar agonistas de receptores acoplados à proteína G podem ser utilmente aplicados ao receptor de GLP-2. Uma metodologia útil para avaliação de compostos quanto a actividade agonista do receptor de GLP-2 é divulgada na Patente U.S. N.º 6077949.

O modo de acção de GLP-2 não está ainda completamente elucidado. Pode ser que opere através de uma cascata de transdução de sinal em que pode haver vários constituintes activos a montante ou a jusante ou ambos do péptido GLP-2. Pode ser possível intervir em qualquer ponto numa tal cascata para produzir uma redução na taxa de reabsorção óssea através do mecanismo da cascata. Isto pode envolver a estimulação da síntese ou da libertação do péptido GLP endógeno ou a administração ou o desencadeamento da síntese endógena ou da libertação de outro composto activo na cascata a jusante do péptido GLP-2, p. ex. um produzido em resposta à ligação do péptido GLP-2 a um receptor.

A formação e o crescimento de osso é um processo complexo consistindo em mudanças no diâmetro e na forma do osso. Este processo ocorre através da activação sequencial de dois tipos celulares: osteoclastos e osteoblastos. Os osteoblastos são de origem mesenquimática derivados de unidades formadoras de colónias de fibroblastos, tal como condrócitos, células musculares e adipócitos. Os osteoblastos são capazes de segregar vários factores (tais como interleucinas-6 e 11; MCS-F e GM-CSF) que podem afectar o desenvolvimento de osteoclastos. Os osteoclastos desenvolvem-se a partir de unidades formadoras de colónias de granulócitos-macrófagos e o seu desenvolvimento é modulado por uma variedade de factores, incluindo interleucinas-1, 3, 6 e 11. Recentemente, centrou-se um considerável interesse na interleucina-6 uma vez que a sua produção em osteoblastos é estimulada por PTH e vitamina D e devido ao seu possível envolvimento em várias doenças incluindo hiperparatiroidismo primário, mieloma múltiplo, artrite reumatóide, doença de Paget e osteoporose hipogonadal.

A produção de interleucina 6 a partir de osteoblastos é regulada por hormonas sexuais (androgénios e estrogénios) que

actuam sobre o promotor de IL-6. O papel de IL-6 (em contraste com IL-11) na função osteoclastica normal não é claro mas em certos estados patológicos o receptor de IL-6 é sobre-regulado e a IL-6 pode então exercer o seu efeito. Em células ósseas derivadas de ratinhos hipogonadais o ARNm de gp80, gp130 e IL-6 está todo aumentado em comparação com as células normais. Assim, é possível que IL-6 tenha um papel importante na perda óssea acelerada associada à osteoporose pós-menopausa.

Segue-se que GLP-2 pode ter um papel importante na regulação tanto do crescimento esquelético na criança como na remodelação esquelética no adulto. GLP-2 pode actuar sobre receptores presentes em células derivadas do osso e a estimulação destas células com GLP-2 conduz a um aumento na concentração de cálcio intracelular e do teor de AMPc celular, resultando na inibição da reabsorção óssea estimulada por PTH.

O termo "sujeito" inclui um ser humano ou outro mamífero e inclui gado e animais de estimação.

A administração pode ser através de qualquer via que o médico perito na arte saiba ser eficaz. A administração parentérica pode ser efectuada através de injeção subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa de uma forma de dosagem no corpo por meio de um seringa estéril, opcionalmente um seringa tipo caneta ou algum outro dispositivo mecânico tal como uma bomba de infusão. Outra opção é uma composição que pode ser um pó ou um líquido para a administração na forma de um spray nasal ou pulmonar. Ainda como outra opção, a administração pode ser transdérmica, p. ex. a partir de um adesivo. As composições adequadas para administração oral, bucal, rectal e vaginal podem também ser proporcionadas. A via de administração oral é preferida para compostos utilizados no presente invento que sejam oralmente eficazes.

O presente invento é ainda ilustrado através dos seguintes Estudos Antecedentes e pelo Exemplo.

ESTUDOS ANTECEDENTES E EXEMPLO

A hematologia e a química sérica incluindo a glicose foram medidas utilizando um analisador automático (Vitros). A

FSH sérica foi medida através de IRMA (Coat-A-Count@/DPC/Los Angeles CA). Os fragmentos C-telopeptídicos séricos da degradação do colagénio de tipo I (S-CTX) foram medidos através de ELISA, ensaio CrossLapsTM do soro (Osteometer BioTech A/S-Denmark). A osteocalcina sérica foi determinada através de ELISA, um ensaio que determina o segmento médio N-terminal da molécula. A insulina sérica e o péptido c foram ambos ensaiados através de RIA (Coat-A-Counts para insulina e Double Antibody C-peptide para o péptido c ambos de DPC, Los Angeles, CA).

Estudo Antecedente 1

Efeito da frutose oral em GLP-1, GTP e velocidade de reabsorção óssea

12 mulheres e homens saudáveis entre 35-40, respectivamente 30-60, foram incluídos num estudo cruzado aleatório, controlado comparando os efeitos da frutose oral em GLP-1, GIP e renovação óssea. Os indivíduos não tinham sofrido doenças suspeitas de afectarem a renovação óssea tais como cancro, artrite reumatóide ou doenças comprometedoras da absorção intestinal ou da excreção/reabsorção a partir do rim nem tinham tido uma história de doenças graves, que pudesse influenciar a condução do estudo. Uma pesquisa laboratorial geral incluindo hematologia e química sérica não deu indicação de disfunção específica de um órgão. Os indivíduos não estavam sob influência de medicação activa para os ossos, passando assim mais de 3 meses desde um tratamento antecedente com cálcio, vitamina D, estrogénio ou progestina em qualquer forma de administração e os indivíduos nunca tinham sido tratados com bisfosfonatos nem fluoreto.

Amostragem

Após jejum desde as 10 h da noite anterior a uma experiência, foram colhidas amostras de sangue entre as 7:30 h e as 8:30 h da manhã. Imediatamente a partir daí foi iniciada a frutose oral. Foram colhidas amostras de sangue, precisamente às 1, 2, 3, 6 e 9 horas após a primeira amostra de sangue. Foi instituído um período de limpeza de 2 semanas entre cada experiência.

Intervenções

A frutose oral consistiu em 75 g de frutose dissolvidos em 300 ml de água com adição de sumo de meio limão.

A frutose oral induziu uma redução de 36% em S-CTX após 2 horas (Figura 1A) enquanto a ocorrência de GLP-1 duplicou para o nível de 220% após 2 horas em comparação com o limiar de 100% em T_0 . O fragmento de GLP-1 é um fragmento do principal fragmento de proglucagon que é clivado e activado no intestino. Concordantemente, a ocorrência das outras partes ou fragmentos duplicou para um nível semelhante a GLP-1 e por essa razão pode fazer parte da associação da redução de S-CTX. O nível de GIP foi quase mantido no limiar.

Estudo Antecedente 2

Efeito de ácidos gordos de cadeia longa orais, AGCL, em GLP-1, GIP e velocidade de reabsorção óssea

12 mulheres e homens saudáveis entre 30-45, respectivamente 30-60, com os mesmos critérios de exclusão que no Estudo Antecedente 1 foram incluídos num estudo cruzado aleatório controlado comparando os efeitos dos ácidos gordos de cadeia longa orais em GLP-1, em GIP e na renovação óssea.

Amostragem

Após jejum desde as 10 h da noite anterior a uma experiência, foram colhidas amostras de sangue entre as 7:30 h e as 8:30 h da manhã. Imediatamente a partir daí foram iniciados os ácidos gordos de cadeia longa orais. Foram colhidas amostras de sangue, precisamente 30 min, 1, 2, 3, 6 e 9 horas após a primeira amostra de sangue. Foi instituído um período de limpeza de 2 semanas entre cada experiência.

Intervenções

Os ácidos gordos de cadeia longa orais consistiram em 70 ml de emulsão de ácidos gordos de cadeia longa (Calogen).

Os AGCL orais induziram uma redução de 37% em S-CTX após 3 horas (Figura 1B) e a ocorrência de GLP-1 duplicou para o nível de 230% após 3 horas em comparação com o limiar de 100% a T_0 . Estes resultados são muito semelhantes aos dados equivalentes do Estudo Antecedente 1. No entanto, a ocorrência

de GIP aumentou significativamente para o nível de 400%. Em comparação com o nível quase mantido de GTP no Estudo Antecedente 1, indicando que GIP não tem nenhuma ou pouca influência na reabsorção óssea.

Estudo Antecedente 3

Efeito da proteína oral em GLP-2, GIP e reabsorção óssea

12 mulheres e homens saudáveis entre 30-45, respectivamente 30-60, com os mesmos critérios de entrada e de exclusão que no Estudo Antecedente 1 foram incluídos num estudo cruzado aleatório controlado comparando os efeitos da proteína oral em GLP-2, em GIP e na renovação óssea.

Amostragem

Após jejum desde as 10 h da noite anterior a uma experiência, foram colhidas amostras de sangue entre as 7:30 h e as 8:30 h da manhã. Imediatamente a partir daí foi iniciada a proteína oral. Foram colhidas amostras de sangue precisamente 30 min, 1, 2, 3, 6 e 9 horas após a primeira amostra de sangue. Foi instituído um período de limpeza de 2 semanas entre cada experiência.

Intervenções

A proteína oral consistiu em 40 g de proteína em pó (Casilan) dissolvida em 600 ml de água.

A proteína oral induziu uma redução de 45% em S-CTX após 2 horas (Figura 1C) enquanto a ocorrência de GLP-2 e GIP aumentou. O nível de GIP aumentou de 8 pM para 17 pM e a ocorrência de GLP-2 aumentou de 36 pM para 57 pM após 1 hora mas diminuiu ligeiramente após 2 horas para o nível de 51 pM. Estes resultados dão razão a uma conclusão semelhante à do Estudo Antecedente 2.

Estudo Antecedente 4

Efeito de uma refeição variada normal em GLP-1, GLP-2 e reabsorção óssea

Foram recrutados 7 pacientes de intestino curto (<140 cm restantes de intestino delgado). Foram estudados 4 mulheres e

3 homens comparando os efeitos de uma refeição variada normal em GLP-1, em GLP-2 e na renovação óssea.

A metodologia da medição de GLP-1 e GLP-2 e a descrição das pessoas do teste foi tal como descrito em detalhe em Jeppesen, P.B. et al., *Gut* 47(3): 370-376, 2000.

Amostragem

Após jejum de um dia para o outro antes da admissão foi colhido sangue venoso periférico 15 minutos antes da refeição de teste e 10, 20, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos após o início da refeição, que ficou completa em 15 minutos.

Intervenções

A refeição variada normal consistiu em pão de centeio, torradas, manteiga, queijo, fiambre, iogurte, banana e sumo de laranja (peso total de 755 g), com um teor energético de 3,92 MJ e uma razão energética de proteína:hidratos de carbono:gordura de 10%:52%:37% avaliada a partir das tabelas alimentares.

Uma refeição variada normal induziu uma redução de 40% de S-CTX após 2 horas (Figura 2) enquanto a ocorrência de GLP-1 e GLP-2 foi aumentada para ambos. O nível de GLP-1 aumentou de 70 pM para 98 pM após 3 horas e a ocorrência de GLP-2 aumentou de 10 pM para 22 pM após 3 horas. Estes resultados indicam que GLP-1 e/ou GLP-2 podem fazer parte da associação da redução em S-CTX.

Exemplo 1

Efeito de uma injecção de GLP-2 em GLP-2_{intacto} e na velocidade de reabsorção óssea

6 mulheres e 3 homens saudáveis entre 24-53 foram incluídos num estudo comparando o efeito de uma injecção de GLP-2 em GLP-2_{intacto} e na renovação óssea.

A descrição da metodologia de medição do GLP-2_{intacto} e do GLP-2 total e a descrição das pessoas do teste foi tal como descrito em detalhe em Hartmann, B. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85(8): 2884-2888, 2000.

Amostragem

Foram tiradas amostras de sangue a intervalos regulares antes, durante e após a injecção.

Intervenções

As pessoas de teste receberam uma única injecção subcutânea de 400 µg de GLP-2 humano sintético.

A injecção de GLP-2 induziu uma redução de 33% de S-CTX após 3 horas enquanto o nível de GLP-2 aumentou naturalmente após a injecção até um pico após 1 hora indicando a associação entre GLP-2 e a redução em S-CTX.

Lisboa, 2008-08-21

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um péptido semelhante a glucagon-2 (GLP-2) ou de um seu análogo, em que, na sequência de aminoácidos de GLP-2, um ou mais aminoácidos foram suprimidos ou um ou mais aminoácidos foram adicionados, ou um ou mais aminoácidos foram substituídos por porções imitadoras de aminoácidos estruturalmente semelhantes mas resistentes a peptidases, ao mesmo tempo que se mantém a capacidade do referido análogo para se ligar a um receptor de GLP-2 e para activar o referido receptor para proporcionar o mensageiro ou sinal resultante do receptor, ou de um sal de adição ácida de um GLP-2, um éster C₁-C₃ de um GLP-2 ou uma amida C₁-C₃ de um GLP-2, no fabrico de um medicamento para o tratamento de perda de massa óssea através da inibição da reabsorção óssea.

2. Utilização reivindicada na reivindicação 1, em que a composição é para administração oral ou através de injecção subcutânea, intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa.

3. Utilização reivindicada na reivindicação 1 ou na reivindicação 2, em que o medicamento é para o tratamento de hiperparatiroidismo, doença de Paget, hipercalcemia de malignidade, lesões osteolíticas produzidas por metástases ósseas, perda óssea devido a imobilização ou deficiência de hormonas sexuais ou osteomalacia.

4. Utilização reivindicada na reivindicação 1 ou na reivindicação 2, em que o medicamento é para o tratamento de osteoporose.

5. Utilização tal como reivindicada na reivindicação 4, em que o medicamento é para o tratamento de osteoporose pós-menopausa.

6. Utilização reivindicada em qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a composição é para administração a um ser humano.

Lisboa, 2008-08-21

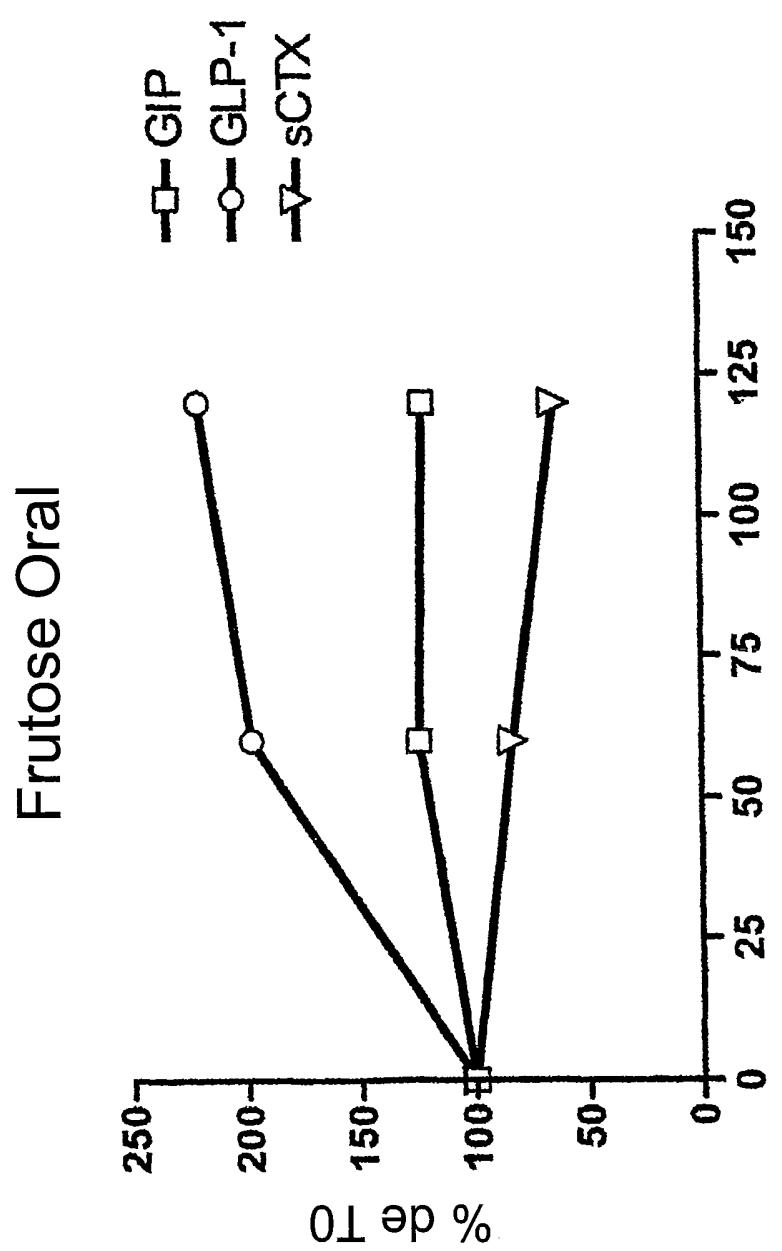


Fig. 1A

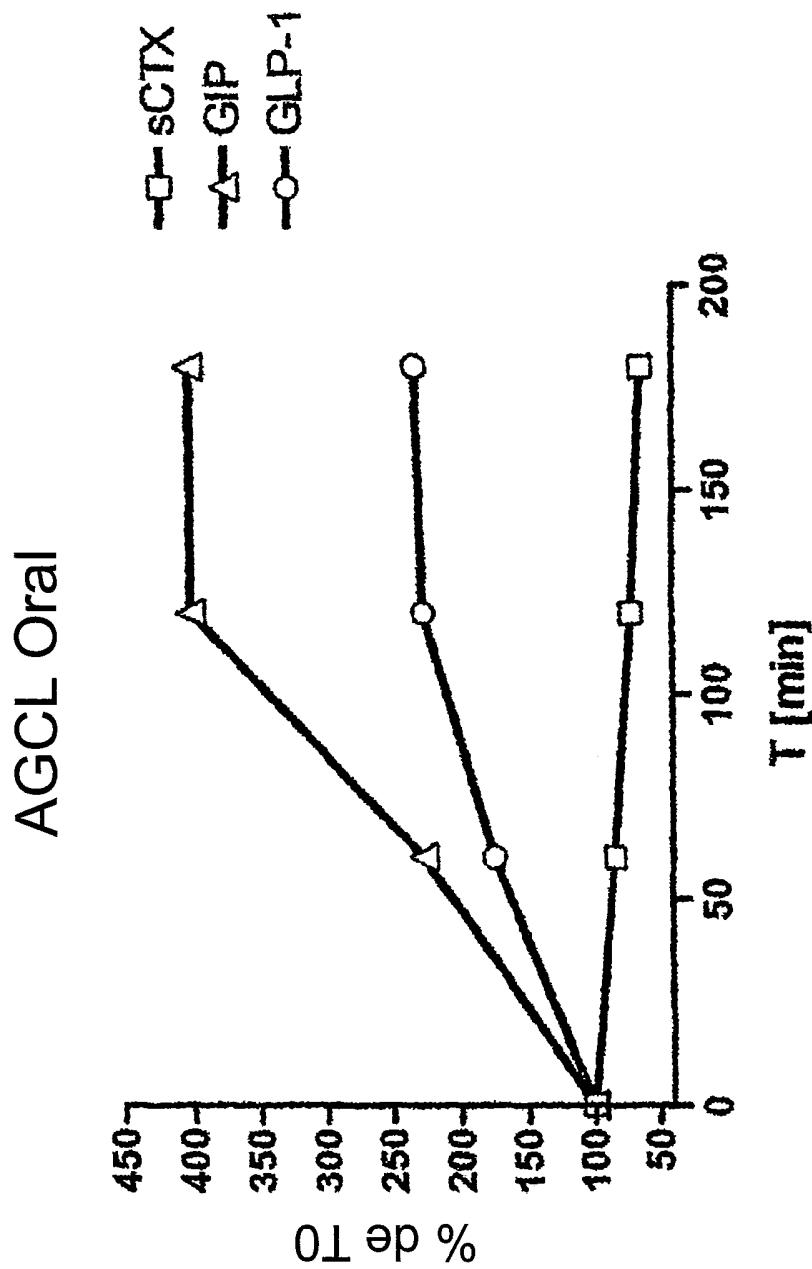


Fig. 1B

Efeito da proteína na reabsorção óssea e GIP/GLP

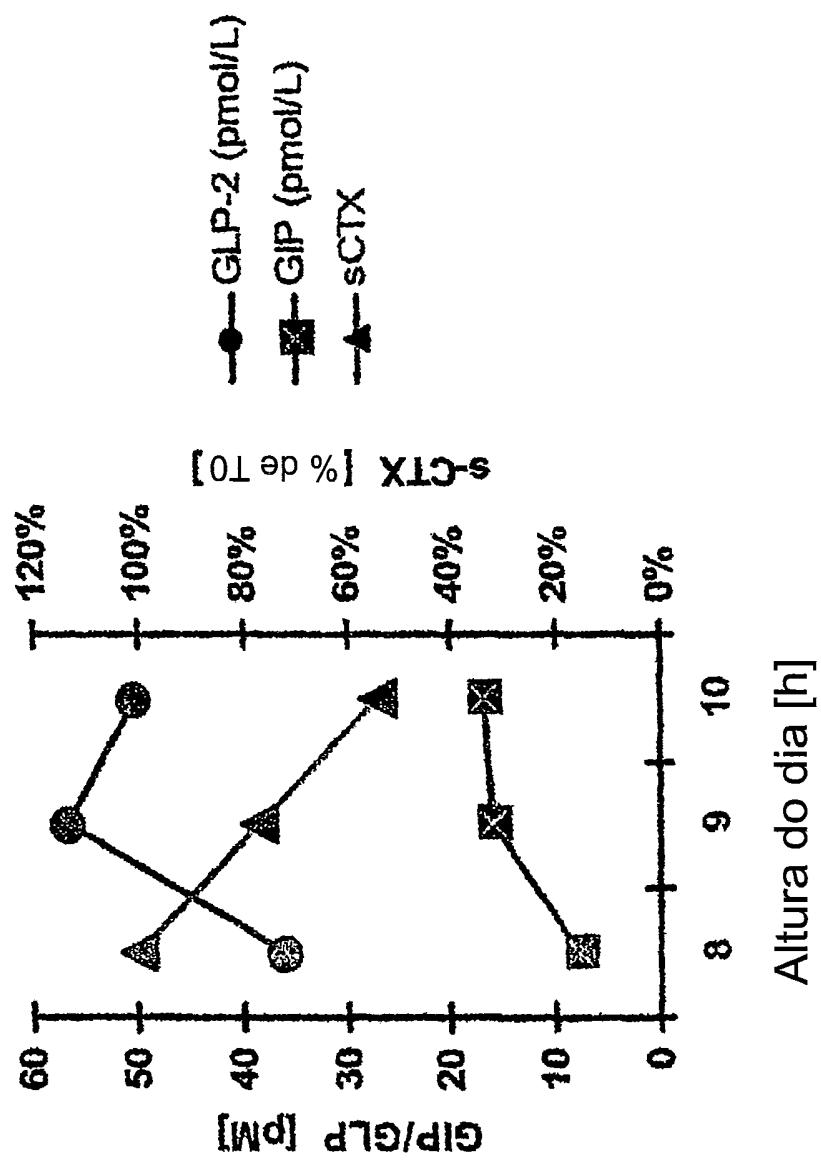


Fig. 1C

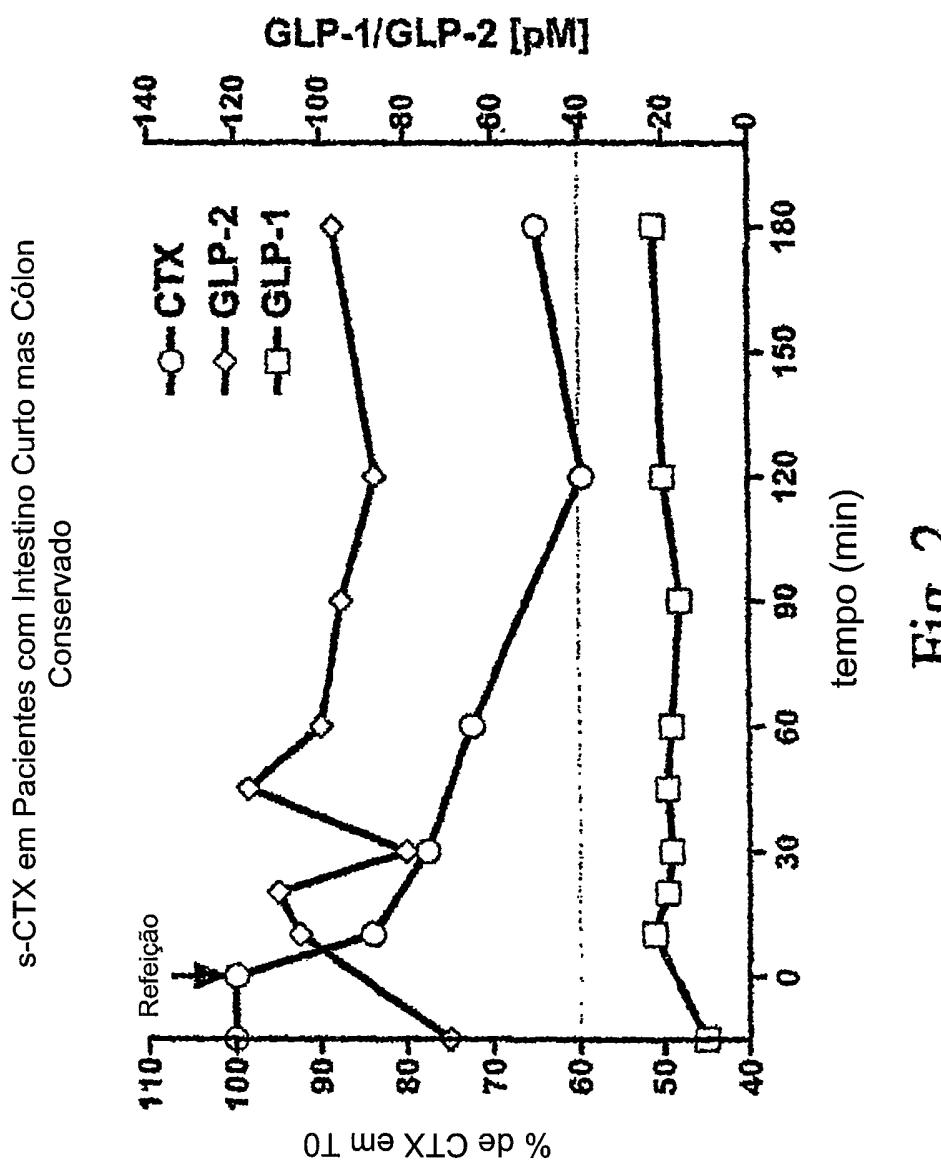


Fig. 2

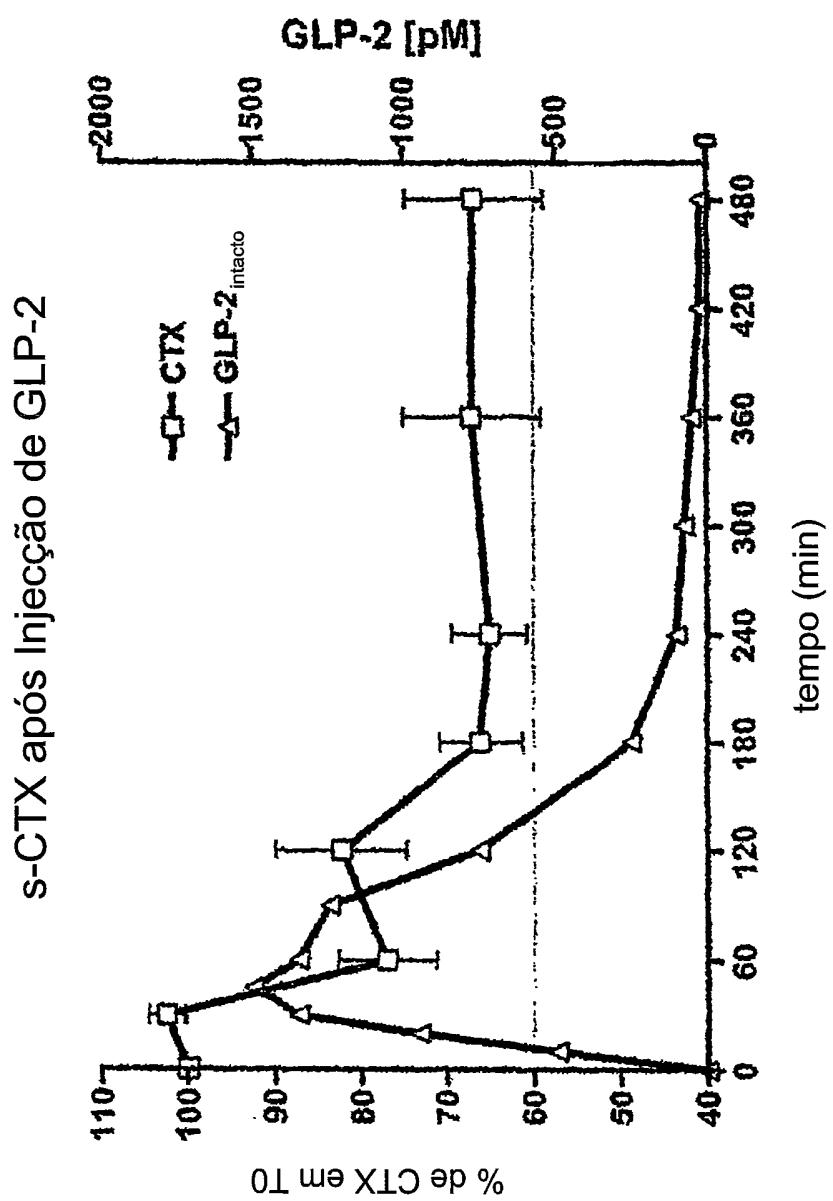


Fig. 3