



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 310 192**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/26** (2006.01)  
**A61P 19/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01982302 .0**  
96 Fecha de presentación : **17.09.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1326630**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

54 Título: **Uso de péptidos GLP-2.**

30 Prioridad: **18.09.2000 GB 0022844**  
**07.12.2000 GB 0029920**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.01.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.01.2009**

73 Titular/es: **Sanos Bioscience A/S**  
**Herlev Hovedgade 207**  
**2730 Herlev, DK**

72 Inventor/es: **Henriksen, Dennis, Bang y**  
**Holst, Jens, Juul**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 310 192 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

Uso de péptidos GLP-2.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere al uso de péptido similar al glucagón 2 (GLP-2) y análogos y derivados de GLP-2 para elaborar medicamentos para el tratamiento de la pérdida de masa ósea por la inhibición de la resorción ósea. Tales composiciones pueden usarse para tratar enfermedades en las que es un factor la resorción ósea y/o la formación insuficiente de hueso, tales como la osteoporosis.

**Antecedentes de la invención**

El péptido similar a glucagón 1 (GLP-1) y el péptido similar a glucagón 2 (GLP-2) son fragmentos de la molécula de proglucagón y la molécula de proglucagón tiene una secuencia de 160 aminoácidos. El proglucagón se origina a partir de preproglucagón que es sintetizado en las células L del fleon distal, en el páncreas y en el cerebro. El procesamiento del preproglucagón para dar GLP-1 y GLP-2 se produce principalmente en las células L.

Se sabe que el péptido similar a glucagón 1 (GLP-1) estimula la secreción de insulina e inhibe la secreción de glucagón y de ese modo disminuye la glucosa en sangre, Andreasen, J. J. y otros (Digestion 55 221-228 (1994)). Generalmente, se sabe que las diversas formas descritas de GLP-1 estimulan la secreción de insulina y la formación de cAMP (véase, por ejemplo, Mojsos, S. (Int. J. Peptide Protein Research 40 333343 (1992))).

El péptido similar a glucagón 2 (GLP-2) es un fragmento peptídico de 33 aminoácidos de proglucagón correspondiente a la secuencia del fragmento de proglucagón 126-158. El GLP-2 muestra una homología notable en términos de secuencias de aminoácidos con el glucagón y el péptido similar a glucagón 1 (GLP-1). Además, las diferentes formas mamíferas de GLP-2 están altamente conservadas. Por ejemplo, el GLP-2 humano (h-GLP-2) y el GLP-2 de degú (un roedor sudamericano) difieren del GLP-2 de rata (rGLP-2) en uno y tres aminoácidos, respectivamente.

Diversas formas de GLP-2 de vertebrado han sido presentadas por muchos autores, incluyendo Buhl y otros, J. Biol. Chem., 1988, 263 (18): 8621, Nishi y Steiner, Mol. Endocrinol., 1990, 4: 1192-8, e Irwin y Wong, Mol. Endocrinol., 1995, 9 (3): 267-77.

Cuando se da exógenamente, el GLP-2 puede producir un notable incremento en la proliferación del epitelio del intestino delgado de los ratones de prueba, aparentemente sin efectos secundarios no deseables (Drucker y otros, 1996, PNAS: USA, 93 7911-7916, WO98/52600). Por otra parte, también se ha observado que el GLP-2 incrementa el grado de transporte máximo de D-glucosa a través de la membrana basolateral intestinal (Cheeseman y Tseng, 1996, American Journal of Physiology 271G477-G482).

La osteoporosis es la enfermedad ósea más común en seres humanos. Es una enfermedad grave y frecuente que se presenta en todo el mundo. El factor de riesgo más importante para la osteoporosis es la deficiencia de estrógenos, y se estima que hasta un tercio de las mujeres posmenopáusicas se verán afectadas si se dejan sin tratar, Schlemmer, A. y otros, Eur. J. Endocrinol. 140: 332-337 (1999). Un episodio primario que conduce a la pérdida ósea osteoporótica es el incremento en la renovación ósea asociado con la menopausia. El incremento agudo en la resorción ósea observado con la disminución en la producción endógena de estrógenos es seguido por un incremento acoplado, pero menos acentuado, en la formación de hueso. Este desequilibrio neto entre resorción y formación da como resultado pérdida de hueso, incrementándose de ese modo el riesgo de fracturas.

Otras enfermedades y trastornos metabólicos que dan como resultado pérdida de la estructura ósea son, por ejemplo, el hiperparatiroidismo, la enfermedad de Paget, la hipercalcemia maligna, las lesiones osteolíticas producidas por metástasis óseas, la pérdida de hueso debida a inmovilización o deficiencia de hormonas sexuales y la osteomalacia.

Sorprendentemente, se ha descubierto ahora que el péptido GLP-2 administrado tiene un efecto sobre la pérdida de masa ósea en seres humanos. Basándose en estas observaciones, es posible ahora proporcionar un medicamento y un método para el tratamiento, incluyendo el tratamiento profiláctico, contra la pérdida de masa ósea en enfermedades o trastornos, tales como osteoporosis, en los que es un factor la resorción ósea y/o la formación insuficiente de hueso.

**Sumario de la invención**

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un péptido similar a glucagón 2 (GLP-2) o de un análogo del mismo en el que, en la secuencia de aminoácidos del GLP-2, se han suprimido uno o más aminoácidos o se han añadido uno o más aminoácidos o uno o más aminoácidos se han sustituido por restos que simulan aminoácidos estructuralmente similares pero resistentes a peptidasa, mientras que se mantiene la capacidad de dicho análogo para unirse a un receptor de GLP-2 y para activar dicho receptor para proporcionar el mensajero o la señal de salida del receptor, o de una sal de adición de ácido de un GLP-2, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> de un GLP-2 o una amida C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> de un GLP-2, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la pérdida de masa ósea mediante la inhibición de la resorción ósea.

En el presente texto, la denominación “un análogo” se usa para indicar un péptido en el que uno o más residuos de aminoácido del péptido originario se han sustituido por otro residuo de aminoácido y/o en el que uno o más residuos de aminoácido del péptido originario se han suprimido y/o en el que uno o más residuos de aminoácido se han añadido al péptido originario.

El término “análogo” incluye además miméticos de dichos péptidos que se unen a los receptores para dichos péptidos y activan dicho receptor para producir un mensajero o señal de salida equivalente en tipo al producido durante la unión de GLP-2. Tales análogos pueden estar adaptados para resistir la degradación en el cuerpo en una extensión mayor que el GLP-2 y así pueden tener una semivida más prolongada o pueden ser administrables oralmente. Tales análogos incluirán pseudopéptidos modelados sobre GLP-2 en los que uno o más residuos de aminoácido se han sustituido por restos que simulan aminoácidos estructuralmente similares pero resistentes a peptidasa.

En el presente texto, la denominación “residuo de aminoácido” indica el residuo de un aminoácido que puede ser codificado por el código genético, a través de un triplete (“codón”) de nucleótidos. En el presente texto, los péptidos a los que se refiere la invención se denominan colectivamente “péptidos GLP-2”.

“Derivados”, mencionados en la presente memoria, incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácidos, sales de carboxilato, ésteres y amidas alifáticas inferiores (por ejemplo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, más preferiblemente C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>). También se incluyen sustancias formadas mediante modificación química de péptido GLP-2 que retienen las propiedades de disminuir la resorción ósea y/o incrementar la formación de hueso del GLP-2 a un nivel equivalente o incrementado.

Preferiblemente, la enfermedad que ha de tratarse en el uso de medicamentos elaborados de acuerdo con la invención es la osteoporosis.

En una realización preferida adicional, el medicamento elaborado de acuerdo con la presente invención se administra oralmente.

Las composiciones descritas en la presente memoria pueden usarse en un método para tratar profilácticamente pérdida de masa ósea en un sujeto con riesgo de desarrollar una enfermedad en la que es un factor la resorción ósea y/o la formación insuficiente de hueso, comprendiendo el método las etapas de a) identificar a un sujeto con riesgo de desarrollar tal enfermedad (que puede ser osteoporosis); y b) administrar al sujeto una cantidad de un medicamento de péptido GLP-2 elaborado de acuerdo con la invención eficaz para inhibir la resorción ósea.

El sujeto es preferiblemente un ser humano.

El GLP-2 puede estabilizarse contra la degradación en el cuerpo mediante modificación química según se describe en WO02/10195.

El compuesto activo usado en la fabricación de un medicamento de acuerdo con la invención puede ser un análogo o derivado oralmente eficaz.

### Breve descripción de los dibujos

La presente invención se ilustra adicionalmente con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Fig. 1 muestra en las gráficas A, B y C resultados obtenidos en los Estudios de Fondo 1-3. La Fig. 1A muestra los niveles de GLP-1, GIP y S-CTX a lo largo de un período de 2-3 horas en respuesta a fructosa oral. El GIP (polipéptido insulínico dependiente de glucosa) es una incretina que estimula la secreción de insulina directamente de una manera dependiente de glucosa. S-CTX es un fragmento de telopéptido C del suero de la degradación con colágeno tipo I. La Fig. 1B muestra los niveles de GLP-1, GIP y S-CTX a lo largo de un período de 2-3 horas en respuesta a ácido graso de cadena larga (LCFA) oral y la Fig. 1C muestra los niveles de GLP-2, GIP y S-CTX a lo largo de un período de 2-3 horas en respuesta a proteína oral.

La Fig. 2 muestra resultados obtenidos en el Estudio de Fondo 4. La figura muestra los niveles de CTX, GLP-1 y GLP-2 en pacientes con intestino corto pero colon preservado durante un período de 3 horas en respuesta a una comida normal.

La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo 1. La figura muestra los niveles de S-CTX y GLP-2<sub>intacto</sub> a lo largo de un período de 7 horas en respuesta a una inyección de GLP-2.

### Descripción detallada de la invención

Esta invención comprende el uso de péptido similar a glucagón 2 (GLP-2) y de análogos y derivados de GLP-2 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la pérdida de masa ósea mediante la inhibición de la resorción ósea, útil para tratar enfermedades en las que es un factor la resorción ósea y/o la formación insuficiente de hueso, tales como la osteoporosis.

Las enfermedades y los trastornos metabólicos que darían como resultado una pérdida de estructura ósea se beneficiarían de tal tratamiento. Por ejemplo, el hiperparatiroidismo, la enfermedad de Paget, la hipercalcemia maligna, las lesiones osteolíticas producidas por metástasis ósea, la pérdida de hueso debida a la inmovilización o la deficiencia de hormonas sexuales y la osteomalacia.

Se conoce bien el uso de marcadores bioquímicos para poder determinar bioquímicamente el nivel de resorción y formación de hueso para evaluar el riesgo de una fractura futura. Sin embargo, existe una variación circadiana considerable con un pico por la mañana temprano y el nivel más bajo por la tarde. Habitualmente esto se asegura ayunando durante la medida.

Esta variación depende del género, la edad y el estadio de la osteoporosis, aunque se observa un nivel de línea de base elevado en mujeres posmenopáusicas. También depende de la actividad física, así, tres días de reposo en cama no cambian la variación en las mujeres posmenopáusicas.

Se ha estudiado la variación circadiana en el cortisol en plasma como un posible factor. Ni los individuos con cortisol insuficiente sustituidos intermitentemente con cortisol para eliminar la variación circadiana ni los estudios con cortisol-pinzamiento en mujeres posmenopáusicas sanas demostraban ninguna influencia sobre la variación circadiana en la resorción ósea. Los estudios con PHT-pinzamiento en mujeres pre- y pos-menopáusicas mostraron que la variación circadiana en la renovación ósea también es independiente de la concentración de PTH en suero. Recientemente, un estudio en mujeres premenopáusicas demostró que la variación circadiana en la resorción ósea medida mediante excreción urinaria de fragmentos de telopéptido C de degradación con colágeno tipo 1 se disminuía significativamente durante el ayuno. Schlemmer, A. y otros, Eur. J. Endocrinol. 140: 332-337 (1999).

Los mecanismos bioquímicos que subyacen a la variación circadiana en la resorción ósea siguen comprendiéndose poco.

Se ha observado una asociación entre los niveles de insulina después de OGTT/glucosa oral y la masa ósea en mujeres posmenopáusicas sanas, Reid, I. R. y otros, The American Physiological Society E655-E659 (1993). Por otra parte, los datos de la línea de base procedentes del Estudio de Rotterdam demostraban que esta asociación estaba presente tanto en hombres como en mujeres ancianos, pero se reducía después de la corrección con respecto a BMI, Stolk, R. P. y otros, Bone 6: 545-549 (1996). En este conjunto, previamente, la fractura no vertebral estaba asociada con un nivel de insulina inferior después de la carga. Los datos de seguimiento preliminares procedentes del estudio sugieren que los niveles de insulina después de la carga de la línea de base corregidos para BMI y la masa ósea están asociados con un riesgo reducido de fracturas no vertebrales accidentales, Hendrikse, J. y otros, ASBMR-IBMS Second Joint Meeting S501. Finalmente, datos procedentes de OGTT/glucosa oral en 19.000 hombres y mujeres suecos sin diabetes conocida sugieren que una glucosa S alta después de la carga en individuos no diabéticos está asociada con un riesgo disminuido de fractura de cadera, Johnell, O. y otros, ASBMR-IBMS Second Joint Meeting S170. Así, parece haber una asociación entre la respuesta a insulina y la masa ósea así como el riesgo de fracturas subsiguiente. Esta asociación puede explicarse parcialmente por una influencia de la insulina sobre la resorción ósea. La posibilidad de tal relación está soportada por la reciente demostración de receptores de insulina sobre células similares a osteoclastos, Thomas, D. M. y otros, Bone 23: 181-186 (1993), y sobre el osteoblasto, Thomas, D. M. y otros, J. Bone Miner. Res. 11: 1312-1320 (1996).

El esqueleto es (entre otras cosas) un depósito de nutrientes, incluyendo minerales tales como calcio y fosfato. Este depósito está habitualmente bien protegido en situaciones de acceso insuficiente a nutrientes que dan lugar a una concentración extracelular decreciente de estos nutrientes, los almacenes de estos en el esqueleto pueden modificarse. Asimismo, en situaciones de acceso insuficiente a nutrientes, la maquinaria metabólica del cuerpo se gradúa para preservar los almacenes.

Para el esqueleto, tal movilización de los almacenes puede alcanzarse estimulando la resorción ósea osteoclástica, y asimismo la resorción puede disminuirse cuando incrementa la disponibilidad dietética de nutrientes.

Tal regulación del metabolismo óseo se ha demostrado previamente para la toma dietética de calcio. Los presentes solicitantes han observado recientemente que la glucosa oral también puede disminuir la resorción ósea, con una disminución completamente expresada en menos de 2 horas.

Esta respuesta es independiente del género y la edad. Un efecto comparable se demostró para la proteína. Así, la toma dietética puede regular la resorción ósea, parcialmente a través de secreción de insulina según se muestra por la prueba de estimulación con insulina.

La toma oral de nutriente produce una caída a corto plazo en la velocidad de resorción ósea. Por otra parte, la administración de insulina en una prueba de tolerancia a insulina (ITT) produce de forma similar una caída a corto plazo en la velocidad medida de resorción ósea.

El nutriente que puede inhibir la resorción ósea puede ser un azúcar, una proteína o un ácido graso, por ejemplo un ácido graso de cadena larga, o un triglicérido, o un mineral.

Se ha observado y descrito que los fármacos comercializados para tratar la osteoporosis tienen efectos secundarios no deseables. Se concluye por Graham, D. Y. y otros, *Aliment Pharmacol Ther* 4: 515-9 (1999) que el alendronato (Fosamax) provoca ulceración gástrica. Por otra parte, se indica que la terapia de sustitución de hormonas (HRT) usada común incrementa el riesgo de cáncer de mama Persson, I. y otros., *Int. J. Cancer* 72 (5): 75825 61 (1997).

Por lo tanto, existe una necesidad de un medicamento para el tratamiento de enfermedades en las que es un factor la resorción ósea y/o la formación insuficiente de hueso, tales como la osteoporosis, que no muestre los efectos secundarios no deseables mencionados anteriormente.

De acuerdo con la presente invención, se muestra ahora sorprendentemente que los fragmentos de GLP-2 de proglucagón producidos en el intestino tienen un papel en la inhibición de la resorción ósea.

El proglucagón expresado en las células  $\alpha$  del páncreas endocrino y en las células L enteroendocrinas del intestino surge de la transcripción de un solo gen y la traducción de mRNAs idénticos en estos dos tejidos. La diversidad biológica en la expresión del gen de proglucagón se presenta al nivel de un procesamiento postraduccional alternativo notablemente específico del tejido, dando como resultado la formación del glucagón peptídico bioactivo en el páncreas y el GLP-1 estimulante de insulina recíproco en el intestino.

Las secuencias del glucagón y el GLP en el intestino y el páncreas, respectivamente, son retenidas como fragmentos de proglucagón no procesados: enteroglucagón (glicentina) en el intestino y el fragmento de proglucagón principal en el páncreas, Habener, J. F., *Diabetes Mellitus* 68-78 (1996).

La glicentina o fragmento de proglucagón 1-69 es segmentada en el páncreas hasta GRPP (polipéptido pancreático relacionado con glicentina) y proglucagón, mientras que el fragmento de proglucagón principal 72-58 es segmentado (procesado) en el intestino hasta los fragmentos GLP-1 (fragmento de proglucagón 78-107) y GLP-2 (fragmento de proglucagón 126-158).

Es notable que el procesamiento alternativo del proglucagón idéntico en el intestino y el páncreas da lugar a péptidos cuyas funciones fisiológicas son opuestas. El GLP-1 del intestino es una hormona anabólica que entre otras cosas facilita la estimulación de la secreción de insulina y la captación de glucosa durante la alimentación, mientras que el proglucagón procedente del páncreas es la hormona catabólica más importante que actúa durante períodos de ayuno para disociar glucógeno (y de ese modo para incrementar la producción de glucosa por el hígado) musculoesquelético y tejido adiposo.

La segmentación proteolítica del proglucagón en el intestino es parte de un proceso complicado. Al menos cuatro péptidos de GLP-1 resultan del procesamiento: dos péptidos de 37 y 36 aminoácidos, GLP-1 (1-37) y amida de GLP-1 (1-36); y dos isopéptidos aminoterminalmente truncados, GLP-1 (7-37) y amida de GLP-1 (7-36). Solo los dos GLP-1s truncados tienen actividades insulínótropas. No se han encontrado actividades biológicas para ninguna de las formas extendidas aminoterminalmente de GLP-1. Ambos isopéptidos de GLP-1, GLP-1 (7-37) y amida de GLP-1 (7-36), tienen potencias insulínótropas en todos los sistemas en los que se han estudiado hasta ahora, incluyendo seres humanos, Habener, J. F., *Diabetes Mellitus* 68-78 (1996). En seres humanos, el producto predominante es amida de GLP-1 (7-36) y se produce muy poca cantidad de las otras formas.

El GLP-1 ha resultado ser un potente péptido insulínotrópico dependiente de glucosa distinto de GIP. El GIP (polipéptido inhibidor gástrico que se ha cambiado a polipéptido insulínotrópico dependiente de glucosa) es una incretina que estimula la secreción de insulina directamente de una manera dependiente de glucosa.

La secuencia de aminoácidos de GIP fue determinada en 1981 por Jornvall y otros, *FEBS Lett* 123: 205 (1981). Sin embargo, la combinación de las dos hormonas GIP y GLP-1 parece constituir la mayoría si no la totalidad del componente hormonal relevante del efecto de la incretina, Nauck, M. A. y otros, *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76 (4): 912-917.

El procesamiento intestinal de proglucagón también da lugar a GLP-2 correspondiente a proglucagón 126-158. Solo se conoce una única forma en seres humanos Hartmann B y otros, *Peptides* 2000; 21 (1) : 73-80.

El GLP-2 parece compartir la mayoría del efecto del GLP-1 sobre la movilidad gastrointestinal y la secreción, Wojdemann, M. y otros, *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84 (7): 2513-2517 y Wo demann, M. y otros, *Scand J Gastroenterol* 1998; 33 (8): 828-832, pero no tiene un efecto directo sobre los islotes pancreáticos. En contraste, el GLP-2 tiene efecto trófico sobre la mucosa intestinal, y puede actuar fisiológicamente como un factor de crecimiento implicado en respuestas adaptativas del intestino a la cirugía o la variación nutricional, Drucker, D. J. y otros, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93 (15): 7911-7916 y Thulesen, J. y otros, *Gut*, en prensa. Inhibe la apoptosis y provoca proliferación epitelial en el intestino delgado Tsai, C. H. y otros, *Am J Physiol* 1997; 273(1 Pt 1): E77-E84, y puede usarse clínicamente para tratar pacientes con el síndrome del intestino corto, Jeppesen, P.B. y otros, *Gastroenterology*, en prensa. Actúa a través de un receptor acoplado a proteína G que se expresa en varias regiones del cuerpo, particularmente en la mucosa intestinal, Munroe, D. G. y otros, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (4): 1569-1573.

Según se usa en la presente memoria, el término "agonista de receptor de GLP-2" significa cualquier molécula que al unirse al receptor de GLP-2 dé como resultado la activación del receptor de GLP-2, e incluye, por ejemplo, GLP-2

o análogos peptídicos de GLP-2. Recientemente, se ha demostrado que el receptor de GLP-2 es un receptor acoplado a proteína G. Así, métodos usados comúnmente en este campo para identificar agonistas de receptores acoplados a proteína G pueden aplicarse útilmente al receptor de GLP-2. Una metodología útil para determinar compuestos con respecto a la actividad agonista de receptor de GLP-2 se describe en la Patente de EE.UU. N° 6077949.

El modo de acción del GLP-2 todavía no se ha elucidado completamente. Puede ser que funcione a través de una cascada de traducción de señales en la que puede haber constituyentes activos bien aguas arriba o bien aguas abajo o ambos desde el péptido GLP-2. Es posible que intervenga en cualquier punto de tal cascada para producir una reducción en la velocidad de resorción ósea mediante el mecanismo de la cascada. Esto puede implicar estimular la síntesis o liberación de péptido GLP endógeno o administrar o iniciar la síntesis o liberación endógena de otro compuesto activo en la cascada aguas abajo del péptido GLP-2, por ejemplo uno producido en respuesta a la unión del péptido GLP-2 a un receptor.

La formación y el crecimiento de hueso es un proceso complejo que consiste en cambios en el diámetro y la conformación del hueso. Este proceso se produce a través de la activación secuencial de dos tipos de células: osteoclastos y osteoblastos. Los osteoblastos son de origen mesenquimal derivados de unidades formadoras de colonias de fibroblastos, como son los condrocitos, células musculares y adipocitos. Los osteoblastos son capaces de secretar un número de factores (tales como interleuquinas 6 y 11; MCS-F y GM-CSF) que pueden afectar al desarrollo de los osteoclastos. Los osteoclastos se desarrollan a partir de unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos y su desarrollo está modulado por una variedad de factores, incluyendo interleuquinas 1, 3, 6 y 11. Recientemente, se ha puesto un interés considerable en la interleuquina-6 debido a que su producción a partir de osteoblastos es estimulada por PTH y vitamina D y debido a que es posible la implicación en varias enfermedades, incluyendo hiperparatiroidismo primario, mieloma múltiple, artritis reumatoide, enfermedad de Paget y osteoporosis hipogonadal.

La producción de interleuquina 6 a partir de osteoblastos es regulada por hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos) que actúan sobre el promotor de Il-6. El papel de la Il-6 (en contraste con Il-11) en la función osteoclástica normal no está claro, pero en ciertos estados patológicos el receptor de Il-6 es regulado al alza y la Il-6 puede entonces ejercer su efecto. En células óseas derivadas de ratones hipogonadales mRNA de gp80, gp130 e Il-6 están incrementados todos en comparación con células normales. Así, es posible que la Il-6 represente un papel importante en la pérdida de hueso acelerada asociada con la osteoporosis posmenopáusica.

Se observa que el GLP-2 puede representar un papel importante en la regulación tanto del crecimiento esquelético en el niño como de la remodelación esquelética en el adulto. El GLP-2 puede actuar sobre receptores presentes en células derivadas del hueso y la estimulación de estas células con GLP-2 conduce a un incremento en la concentración de calcio intracelular y el contenido de cAMP celular, dando como resultado la inhibición de la resorción ósea estimulada por PTH.

El término "sujeto" incluye un ser humano u otro mamífero e incluye ganado y mascotas.

La administración puede ser a través de cualquier ruta que el médico de experiencia normal sepa que es eficaz. La administración parenteral puede realizarse mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa de una forma de dosificación al cuerpo por medio de una jeringa estéril, opcionalmente una jeringa tipo pluma o algún otro dispositivo mecánico tal como una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que pueda ser un polvo o un líquido para la administración en forma de un aerosol nasal o pulmonar. Como una opción adicional más, la administración puede ser transdérmica, por ejemplo desde un parche. También pueden proporcionarse composiciones adecuadas para la administración oral, bucal, rectal y vaginal. La ruta de administración oral se prefiere para los compuestos usados en la presente invención que son oralmente eficaces.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Estudios de Fondo y el Ejemplo.

## Estudios de fondo y ejemplo

La hematología y la química sérica incluyendo la glucosa se midieron usando un autoanalizador (Vitros). La FSH en suero se midió mediante IRMA (Coat-ACount@/DPC/Los Angeles CA). Los fragmentos de telopéptido C sérico de degradación con colágeno tipo I (S-CTX) se midieron mediante ELISA, ensayo sérico CrossLaps™ (Osteometer BioTech A/S-Dinamarca). La osteocalcina sérica se determinó mediante ELISA, un ensayo que determina el segmento medio N-terminal de la molécula. La insulina y el péptido c séricos se determinaron ambos mediante RIA (Coat-ACounts para insulina y Double Antibody C-peptide para péptido c, ambos DPC, Los Angeles, CA).

### Estudio de Fondo 1

#### *Efecto de fructosa oral sobre GLP-1, GTP y la velocidad de resorción ósea*

12 mujeres y hombres sanos de entre 30-45, respectivamente 30-60, se incluyeron en un estudio cruzado controlado aleatorizado que compara los efectos de fructosa oral sobre GLP-1, sobre GIP y sobre la renovación ósea. Los individuos no habían sufrido enfermedades que se sospechara que afectarían a la renovación ósea, tales como cáncer,

artritis reumatoide o enfermedades que comprometieran la absorción del intestino o la excreción/reabsorción del riñón ni habían tenido una historia de enfermedades graves, que pudieran influir en la conducta del estudio. Un rastreo de general laboratorio que incluía hematología y química sérica no daba indicación de disfunción orgánica específica. Los individuos no estaban bajo la influencia de una medicación activa para el hueso, así, habían pasado más de tres meses desde un tratamiento previo con calcio, vitamina D, estrógeno o progestina en cualquier forma de administración y los individuos no habían sido tratados nunca con bisfosfonatos o fluoruro.

## Muestreo

Después de ayunar desde las 10 p.m. la noche anterior a un experimento, se recogieron muestras de sangre entre las 7:30 a.m. y las 8:30 a.m. Inmediatamente después, se empezó con la fructosa oral. Precisamente a las 1, 2, 3, 6 y 9 horas después de la primera muestra de sangre, se recogieron muestras de sangre. Se instituyó un período de depuración de 2 semanas entre cada experimento.

## Intervenciones

La fructosa oral consistía en 75 g de fructosa disueltos en 300 ml de agua con zumo de medio limón añadido.

La fructosa oral inducía a una reducción de 36% en el S-CTX después de 2 horas (Figura 1A), mientras que la presencia de GLP-1 se doblaba hasta el nivel de 220% después de 2 horas en comparación con la línea de base de 100% a T<sub>0</sub>. El fragmento de GLP-1 es un fragmento del fragmento de proglucagón principal que se segmenta y se activa en el intestino. De acuerdo con esto, la presencia de las otras partes o fragmentos se doblan hasta un nivel similar que el GLP-1 y por lo tanto pueden tomar parte en la asociación de la reducción en el S-CTX. El nivel de GIP casi se mantenía en la línea de base.

## Estudio de Fondo 2

### *Efecto de ácidos grasos de cadena larga, LCGA, orales sobre GLP-1, GIP y la velocidad de resorción ósea*

12 mujeres y hombres sanos de entre 30-45, respectivamente 30-60, con los mismos criterios de inclusión y exclusión que en el Estudio de Fondo 1 se incluyeron en un estudio cruzado controlado aleatorizado que comparaba los efectos de ácidos grasos de cadena larga orales sobre GLP-1, sobre GIP y sobre la renovación ósea.

## Muestreo

Después de ayunar desde las 10 p.m. la noche anterior a un experimento, se recogieron muestras de sangre entre las 7:30 a.m. y las 8:30 a.m. Inmediatamente después, empezó con los ácidos grasos de cadena larga orales. Precisamente a los 30 min, 1, 2, 3, 6 y 9 horas después de la primera muestra de sangre, se recogieron muestras de sangre. Se instituyó un período de depuración de 2 semanas entre cada experimento.

## Intervenciones

Los ácidos grasos de cadena larga orales consistían en 70 ml de emulsión de ácidos grasos de cadena larga (Calogen).

Los LCFA orales inducían una reducción de 37% en el S-CTX después de 3 horas (Figura 1B) y la presencia de GLP-1 se doblaba hasta el nivel de 230% después de 3 horas en comparación con la línea de base de 100% en T<sub>0</sub>. Estos resultados eran muy similares a los datos equivalentes del Estudio de Fondo 1. Sin embargo, la presencia de GIP se incrementaba significativamente hasta el nivel de 400%. La comparación con el nivel casi mantenido de GTP en el Estudio de Fondo 1 indicaba que el GIP tiene poca influencia o una influencia muy pequeña sobre la resorción ósea.

## Estudio de Fondo 3

### *Efecto de proteína oral sobre GLP-2, GIP y la velocidad de resorción ósea*

12 mujeres y hombres sanos de entre 30-45, respectivamente 30-60, con los mismos criterios de inclusión y exclusión que en el Estudio de Fondo 1 se incluyeron en un estudio cruzado controlado aleatorizado que comparaba los efectos de proteína oral sobre GLP-1, sobre GIP y sobre la renovación ósea.

## Muestreo

Después de ayunar desde las 10 p.m. la noche anterior a un experimento, se recogieron muestras de sangre entre las 7:30 a.m. y las 8:30 a.m. Inmediatamente después, se empezó con la proteína oral. Precisamente a los 30 min, 1, 2, 3, 6 y 9 horas después de la primera muestra de sangre, se recogieron muestras de sangre. Se instituyó un período de depuración de 2 semanas entre cada experimento.

## ES 2 310 192 T3

### *Intervenciones*

La proteína oral consistía en 40 g de polvo de proteína (Casilan) disuelto en 600 ml de agua.

- 5 La proteína oral inducía una reducción de 45% en el S-CTX después de 2 horas (Figura 1C) mientras que se incrementaba la presencia tanto de GLP-2 como de GIP. El nivel de GIP se incrementaba desde 8 pM hasta 17 pM y la presencia de GLP-2 se incrementaba desde 36 pM hasta 57 pM después de 1 hora, pero disminuía ligeramente después de 2 horas hasta el nivel de 51 pM. Estos resultados están de acuerdo con una conclusión similar a la del Estudio de Fondo 2.

10

### Estudio de Fondo 4

#### *Efecto de una comida mixta normal sobre GLP-1, GLP-2 y la velocidad de resorción ósea*

15

Se reclutaron 7 pacientes con intestino corto (<140 cm de intestino delgado remanente). Se estudiaron 4 mujeres y 3 hombres comparando los efectos de una comida mixta normal sobre GLP-1, sobre GLP-2 y sobre la renovación ósea.

- 20 Esta metodología de la medida de GLP-1 y GLP-2 y la descripción de las personas de la prueba eran como se describen con detalle en Jeppesen, P. B. y otros, Gut 2000; 47 (3): 370-376.

### *Muestreo*

- 25 Después de un ayuno nocturno antes de la administración, se recogió sangre venosa periférica 15 minutos antes de la comida de prueba y 10, 20, 30, 45, 60, 120 y 180 minutos después del comienzo de la comida, que se terminaba en 15 minutos.

### *Intervenciones*

30

La comida mixta normal consistía en pan de centeno, tostada, mantequilla, queso, jamón, yogur, plátano y zumo de naranja (peso total 755 g) con un contenido energético de 3,92 MJ y una relación energética de proteínas:carbohidratos:grasas de 10%:52%:37% evaluada a partir de tablas de alimentos.

- 35 Una comida mixta normal inducía una reducción de 40% en el S-CTX después de 2 horas (Figura 2), mientras que se incrementaba la presencia tanto de GLP-1 como de GLP-2. El nivel de GLP-1 se incrementaba desde 70 pM hasta 98 pM después de 3 horas y la presencia de GLP-2 se incrementaba desde 10 pM hasta 22 pM después de 3 horas. Estos resultados indican que el GLP-1 y/o el GLP-2 pueden tomar parte en la asociación de la reducción en S-CTX.

40

### Ejemplo 1

#### *Efecto de una inyección de GLP-2 sobre GLP-2<sub>intacta</sub> y la velocidad de resorción ósea*

- 45 6 mujeres sanas y 3 hombres sanos entre 24-53 se incluyeron en un estudio que compara el efecto de una inyección de GLP-2 sobre GLP-2<sub>intacta</sub> y sobre la renovación ósea.

La descripción de la metodología de medida de GLP-2<sub>intacta</sub> y GLP-2 total y la descripción de las personas de la prueba eran como se describen con detalle en Hartmann, B. y otros, J Clin Endocrinol Metab 2000; 85 (8): 2884-2888.

50

### *Muestreo*

Se extrajeron muestras de sangre a intervalos regulares antes, durante y después de la inyección.

- 55 *Intervenciones*

Las personas de prueba recibían una inyección subcutánea en bolo de 400 µg de GLP-2 humano sintético.

- 60 La inyección de GLP-2 inducía una reducción de 33% en el S-CTX después de 3 horas, mientras que el nivel de GLP-2 se incrementaba naturalmente después de la inyección hasta un máximo después de 1 hora, indicando la asociación entre GLP-2 y la reducción en S-CTX.

65



**REIVINDICACIONES**

1. El uso de un péptido similar a glucagón 2 (GLP-2) o de un análogo del mismo en el que, en la secuencia de aminoácidos del GLP-2, se han suprimido uno o más aminoácidos o se han añadido uno o más aminoácidos o uno o más aminoácidos se han sustituido por restos que simulan aminoácidos estructuralmente similares pero resistentes a peptidasa, mientras que se mantiene la capacidad de dicho análogo para unirse a un receptor de GLP-2 y para activar dicho receptor para proporcionar el mensajero o la señal de salida del receptor, o de una sal de adición de ácido de un GLP-2, un éster C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> de un GLP-2 o una amida C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> de un GLP-2, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la pérdida de masa ósea mediante la inhibición de la resorción ósea.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la composición es para administración oral o mediante inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el medicamento es para el tratamiento del hiperparatiroidismo, la enfermedad de Paget, la hipercalcemia maligna, las lesiones osteolíticas producidas por metástasis óseas, la pérdida de hueso debida a inmovilización o deficiencia de hormonas sexuales o la osteomalacia.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el medicamento es para el tratamiento de la osteoporosis.

5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el medicamento es para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica.

6. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la composición es para la administración a un ser humano.

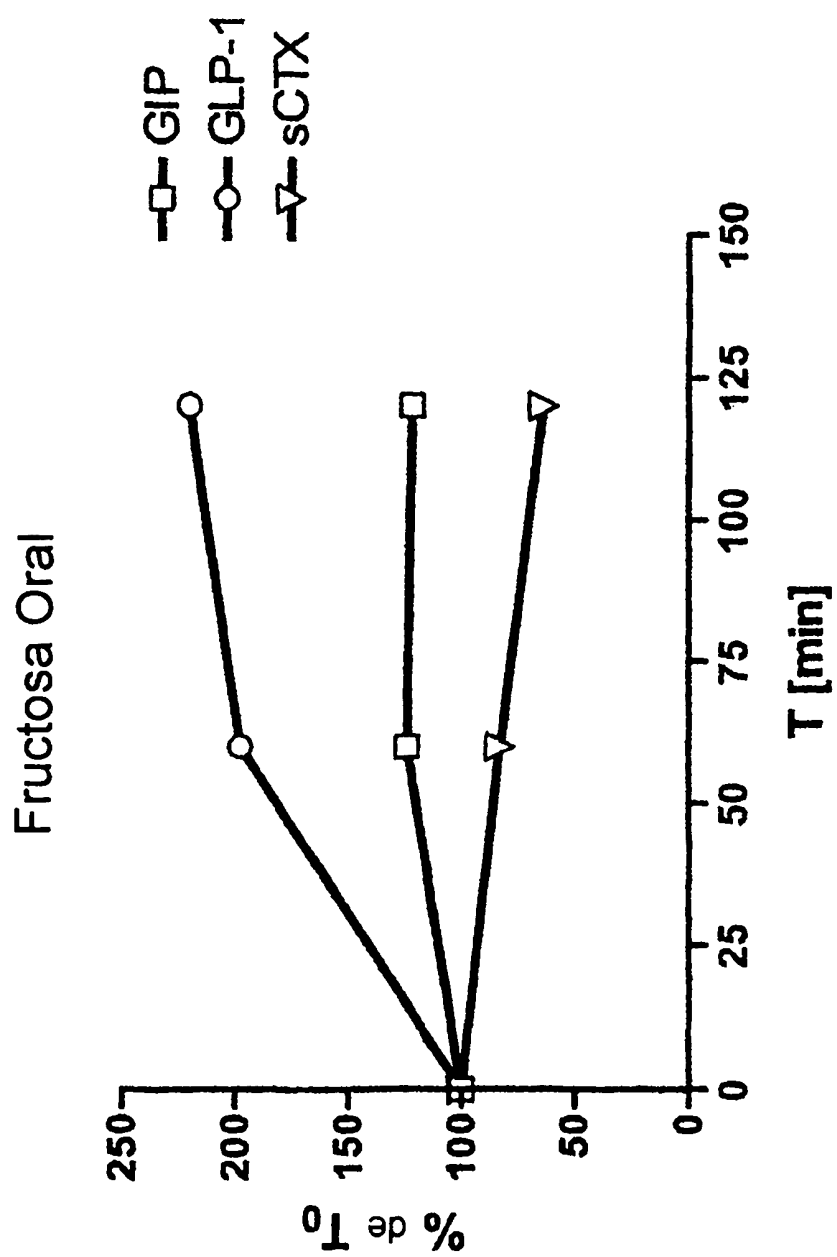


Fig. 1A

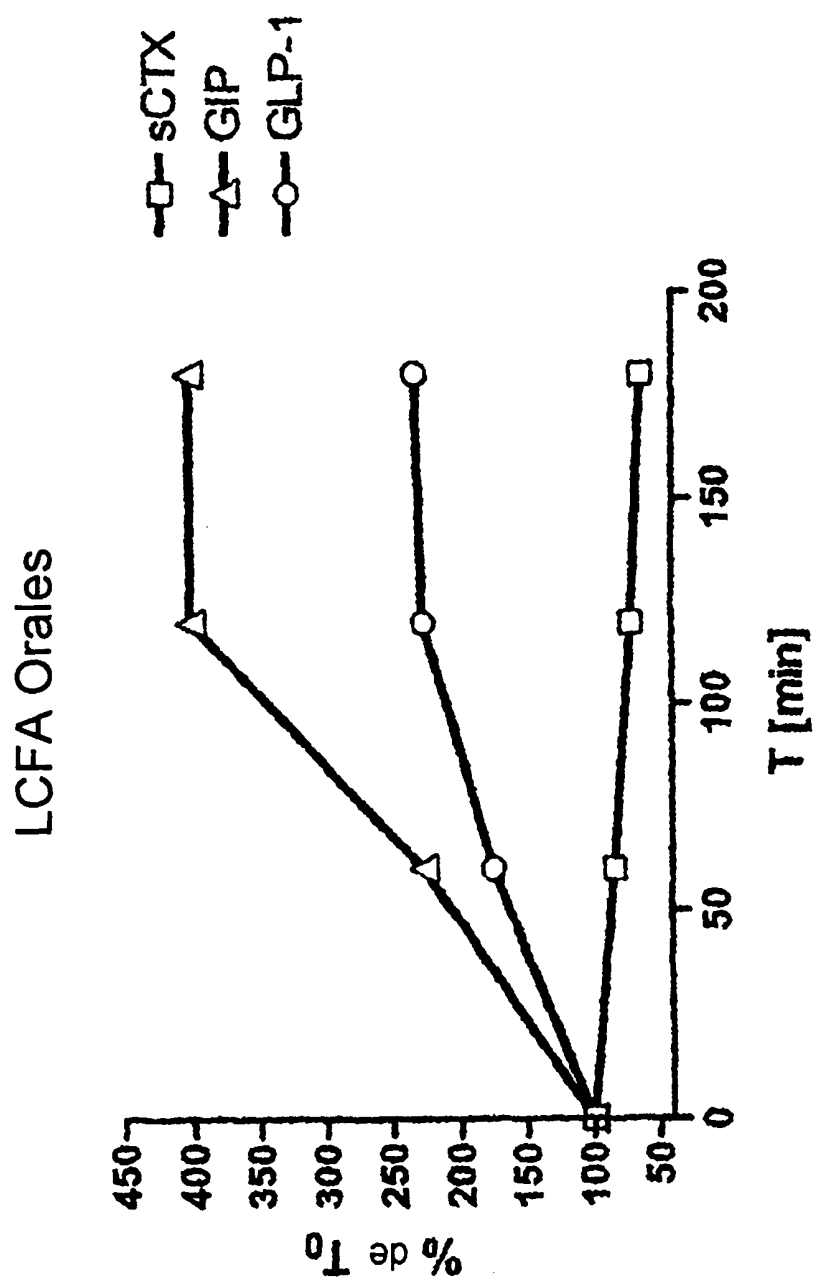


Fig. 1B

Efecto de proteína sobre la resorción ósea y GIP/GLP

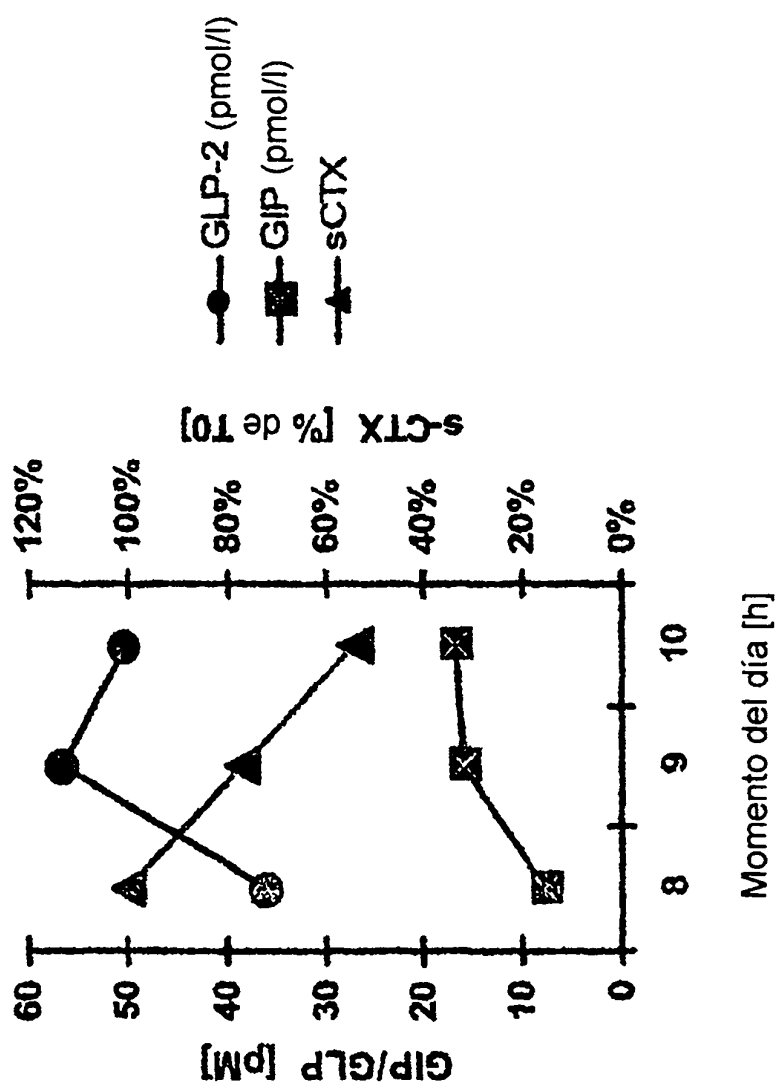


Fig. 1C

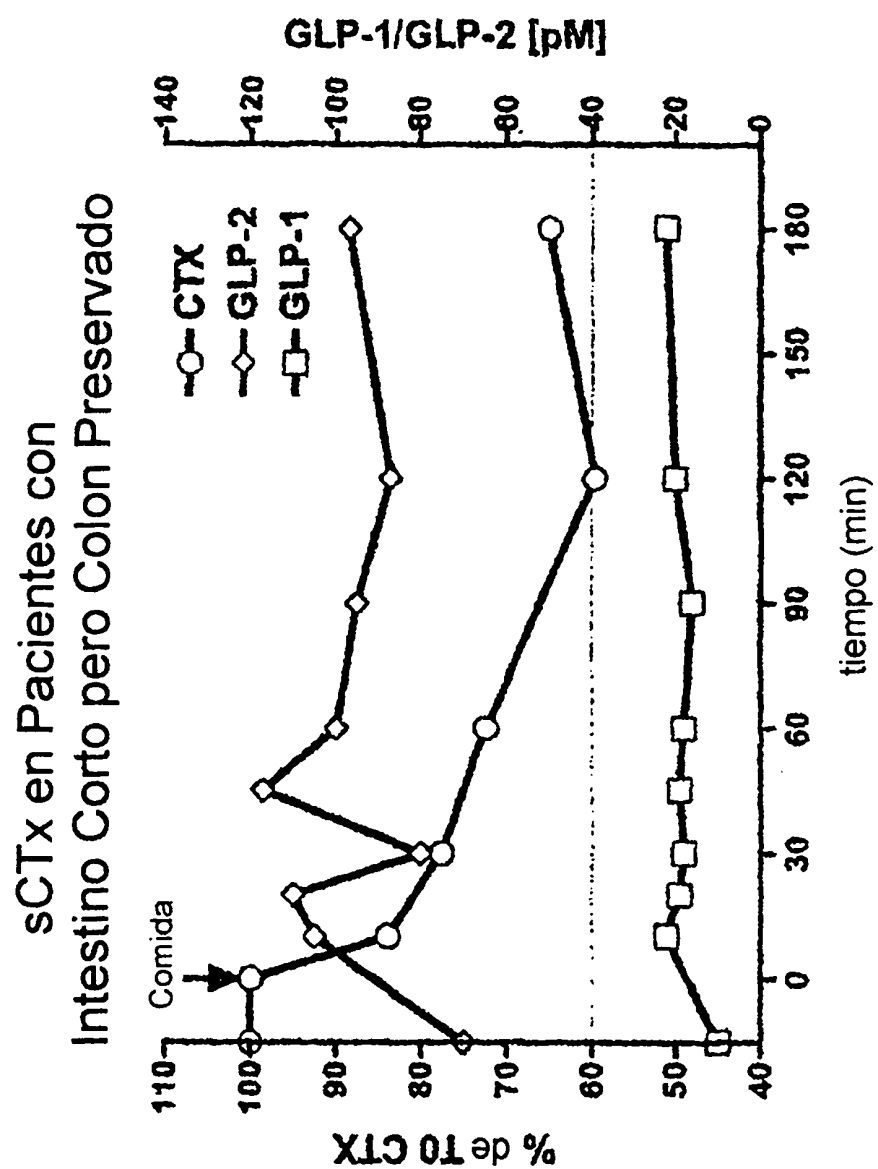


Fig. 2

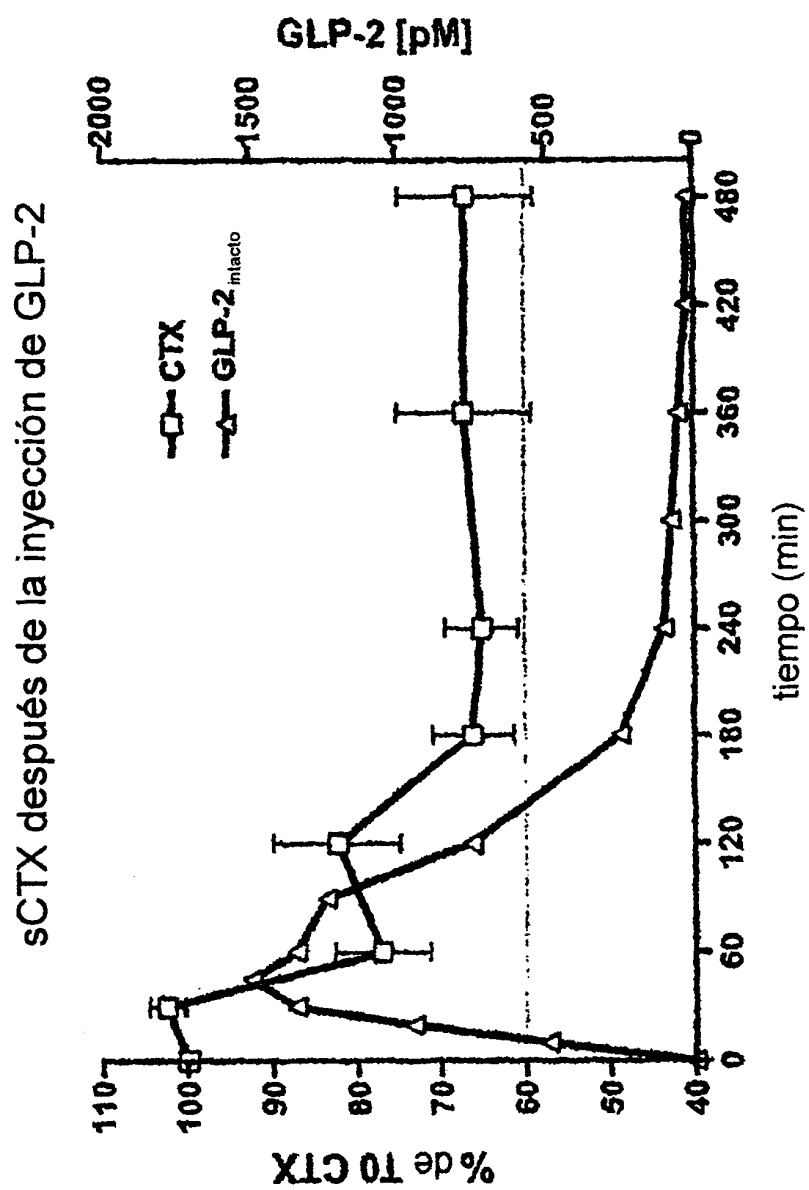


Fig. 3