



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 861**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97938640 .6**
96 Fecha de presentación : **26.08.1997**
97 Número de publicación de la solicitud: **0964873**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.1999**

54 Título: **Uso del péptido-1 similar al glucagón GLP-1 o de sus análogos para suprimir cambios catabólicos después de cirugía.**

30 Prioridad: **30.08.1996 US 24982 P**
21.08.1997 US 916991

73 Titular/es: **ELI LILLY AND COMPANY**
Lilly Corporate Center
Indianapolis, Indiana 46285, US

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

72 Inventor/es: **Efendic, Suad**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 318 861 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 del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) o de sus análogos para suprimir cambios catabólicos después de cirugía.

5

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

Esta invención se refiere a la recuperación después de cirugía por prevenir la reacción catabólica causada por el trauma quirúrgico.

2. Antecedentes informativos

Aproximadamente se realizan en el mundo occidental anualmente 20-25.000 tratamientos quirúrgicos por cada millón de habitantes. La cirugía, al igual que cualquier trauma, inicia cambios marcados en el metabolismo (Shaw, J.H.F. y otros, *Ann. Surg.*, 209(1): 63-72 (1986); Little, R.A. y otros, *Prog. Clin. Biol. Res.* 263A: 463-475 (1987); Frayn, K.N., *Clin. Endocrinol.* 24:577-599 (1986); Brandi, L. y otros, *Clin. Sci.* 85:525-35 (1993)). La síntesis acelerada de glucosa, el combustible principal de la reparación de tejidos, es un cambio importante después de la cirugía y se produce a expensas de las reservas de proteína y energía del cuerpo. (Gump.F.E. y otros, *J. Trauma*, 14:378-88 (1974); Black, R.B., y otros. *Ann. Surg.* 196:420-35 (1982)).

Estos cambios se han atribuido anteriormente a las hormonas de tensión glucorreguladoras y otros factores catabólicos, tales como citocinas, que se liberan como respuesta al trauma. Cuanto más marcado es el cambio hacia el catabolismo, mayor es la morbilidad y más lenta es la recuperación del paciente (Thorell, A. y otros, *Eur. J. Surg.*, 159:593-99 (1993); Chernow, B. y otros, *Arch. Intern. Med.*, 147:1273-8 (1987)).

Los estados catabólicos posoperatorios se pueden tratar con hormonas anabólicas, en particular la hormona del crecimiento e IGF-1 (Hammarkvist, F. y otros, *Ann. Surg.* 216(2): 184-190 (1991); Ziegler, T., y otros, *Annu. Rev. Med.*, 45:450-80 (1994); Ziegler, T.R., y otros, *J. Parent. Ent. Nutr.* 14(6):574-81 (1990)). Algunos estudios revelan un claro beneficio del tratamiento con insulina en pacientes con trauma catabólico (Hinton, P. y otros, *Lancet*, 17 (abril): 767-69 (1971); Shizgal, H. y otros, *Am. J. Clin. Nutr.*, 50:1355-63 (1989); Woolfson, A.M.J. y otros, *N. Clin. Nutr.* 50:1355-63 (1989); Woolfson, A.M.J., y otros, *N. Engl. J. Med.* 300:14-17 (1979); Brooks, D. y otros, *J. Surg.* 40:395-405 (1986); Sakurai, Y., y otros, *Ann. Surg.*, 222:283-97 (1995)).

35

Otros estudios, sin embargo, revelan que los beneficios posoperatorios de la insulina con frecuencia se ven comprometidos por la resistencia a la insulina. En la resistencia a la insulina, concentraciones normales de insulina dan lugar a respuestas inferiores a las que se pueden calificar de normales. La resistencia a la insulina puede ser debida a una disminución de la unión de la insulina a receptores de la superficie celular, o a alteraciones del metabolismo intracelular. El primer tipo, caracterizado como una disminución de la sensibilidad a la insulina, típicamente se puede eludir aumentando la concentración de insulina. El segundo tipo, caracterizado como disminución de la receptividad de la insulina, no se puede eludir con grandes cantidades de insulina.

40

La resistencia a la insulina después de un trauma se puede superar con dosis de insulina que son proporcionales al grado de resistencia a la insulina y es así aparentemente una disminución de la sensibilidad a la insulina (Brandt, L.S., y otros, *Clin. Science* 79:443-450 (1990); Henderson, A.A., y otros, *Clin.Sci.* 80:25-32 (1990)). La reducción a la sensibilidad a la insulina después de una cirugía abdominal programada dura al menos 5 días, pero no más de 3 semanas, y es muy profunda el primer día después de la operación, pudiendo tardarse hasta 3 semanas para que se normalice (Thorell, A. y otros, (1993)).

50

Las causas de la resistencia transitoria a la insulina observada después de un trauma no se conocen bien. Tanto el cortisol como el glucagón pueden contribuir a la respuesta catabólica al trauma (Alberti, K.G.M.M., y otros, *J. Parent. Ent. Nutr.* 4(2):141-46 (1980); Gelfand, R.A., y otros, *J. Clin. Invest.* 74(diciembre):2238-2248 (1984); Marliss, E.B., y otros, *J. Clin. Invest.* 49:2256-70 (1970)). Sin embargo, estudios de resistencia posoperatoria a la insulina no han podido demostrar una correlación entre los cambios en estas hormonas catabólicas y cambios en la sensibilidad a la insulina después de cirugía. (Thorell, A., y otros, (1993); Thorell, A., Karolinska Hospital and Institute, 10401, Stockholm, Suecia (1993); Thorell, A., y otros, *Br. J. Surg.* 81:59-63 (1994)).

55

Una disponibilidad incrementada de lípidos después de trauma puede inducir resistencia a la insulina mediante el ciclo de glucosa-ácido graso (Randle, P.J., y otros, *Diab. Metab. Rev.* 4(7): 623-38 (1988)). Una incrementada disponibilidad de ácidos grasos (FFA) indujo resistencia a la insulina y cambió la oxidación del sustrato de glucosa a grasa, incluso en presencia de infusiones simultáneas de insulina (Ferrannini, E., y otros, *J. Clin. Invest.* 72: 1737-47 (1983); Bevilacqua, S., y otros, *Metabolism*, 36:502-6 (1987); Bevilacqua, S., y otros, *Diabetes* 39:383-89 (1990); Bonadonna, R.C., y otros, *Am. J. Physiol.* 259:E736-50 (1990); Bonadonna, R.C., y otros, *Am. J. Physiol.* 257:E49-56 (1989)).

65

La cirugía programada se realiza rutinariamente después de una noche de ayuno para reducir los riesgos de anes-tesia. Esta arraigada práctica de ayuno del paciente durante una noche (10-16 horas) antes de la cirugía intensifica el

desarrollo del estado catabólico y empeora la resistencia a la insulina. Los estudios en ratas sometidas a tensión, tal como hemorragia y endotoxemia, revelan que el ayuno durante períodos inferiores a 24 horas afecta marcadamente a la respuesta catabólica al trauma (Alibegovic, A., y otros, *Circ. Shock*, 39:1-6 (1993); Eshali, A.H., y otros, *Eur. J. Surg.*, 157:85-89 (1991), Ljungvist, O., y otros, *Am. J. Physiol.*, 22:E692-98 (1990)). Incluso un período corto de ayuno antes de que se manifieste un trauma en ratas disminuye marcadamente las reservas de hidratos de carbono, cambia profundamente el medio hormonal, aumenta la respuesta a la tensión y, muy importante, aumenta la mortalidad (Alibegovic, A., y otros, *Circ. Shock*, 39:1-6 (1993)).

La administración de insulina antes de cirugía, por vía oral (Nygren, J., y otros, *Ann. Surg.* 222:728-34(1995)) o por infusión, reduce la resistencia a la insulina después de cirugía en comparación con pacientes que han ayunado. Los pacientes que recibieron infusiones de insulina durante la noche 5 (mg/kg/min) antes de cirugía abdominal electiva perdieron una media de 32% de sensibilidad a la insulina después de la operación, mientras que los pacientes que fueron operados quirúrgicamente después de un ayuno rutinario durante la noche perdieron el 55% de su sensibilidad a la insulina (Ljungvist, O., y otros, *J. Am. Coll. Surg.* 178:329-36 (1994)).

Además de los efectos adversos del ayuno sobre la recuperación después de la cirugía, la inmovilización del paciente y la nutrición hipocalórica durante y después de la cirugía se ha encontrado que inducen un aumento de 20-30% de la resistencia a la insulina periférica en voluntarios sanos. Así, la resistencia posoperatoria a la insulina dada a conocer anteriormente después de infusiones preoperatorias de insulina (Ljungvist, O. (1994)) puede ser debida en parte a los efectos aditivos de la permanencia posoperatoria en cama y la nutrición hipocalórica.

Dada la preponderancia de la cirugía, es importante minimizar efectos secundarios negativos tales como la respuesta catabólica y la resistencia a la insulina con el fin de mejorar la curación y reducir la mortalidad. La resistencia posoperatoria a la insulina frustra el tratamiento con insulina del estado catabólico. La arraigada práctica del ayuno preoperatorio exacerba el estado catabólico posoperatorio y la resistencia a la insulina. Así, se necesita un tratamiento que eluda el estado catabólico y la resistencia a la insulina.

Como se discute en esta memoria, un tratamiento que elude tanto el estado catabólico como la resistencia a la insulina es la administración de glucosa e insulina juntas antes, durante y después de la operación. Sin embargo, la infusión de insulina crea el potencial de una hipoglucemia, que se define como una concentración de glucosa en sangre por debajo de 0,03 mM. La hipoglucemia aumenta el riesgo de arritmia ventricular y es una consecuencia peligrosa de la infusión de insulina. Con el fin de prevenir la hipoglucemia se desarrolló un algoritmo para la infusión de insulina en diabéticos (Hendra, T.J., y otros, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 16:2123-220 (1992)). Sin embargo, el 21% de los pacientes desarrolló hipoglucemia con este algoritmo. En otro estudio de control de la glucosa después de infarto de miocardio, 18% de los pacientes desarrolló hipoglucemia cuando fueron infundidos con insulina y glucosa (Malmberg, K.A., y otros, *Diabetes Care*, 17:1007-1014 (1994)).

También, la infusión con insulina requiere un control frecuente de los niveles de glucosa en sangre, con lo que se puede detectar la manifestación de hipoglucemia y aplicar el remedio tan pronto como sea posible. En pacientes que recibieron infusión de insulina en el estudio citado (Malmberg, 1994), la glucosa en sangre se midió como mínimo cada dos horas y se ajustó consecuentemente la velocidad de infusión. Así, la seguridad y eficacia de la terapia de infusión de insulina para pacientes de infarto de miocardio depende de un acceso fácil y rápido a datos de glucosa en sangre. Esta intensa necesidad de controlar glucosa en sangre representa una pesada carga para los profesionales que cuidan de la salud y aumenta los inconvenientes y el coste del tratamiento. Como resultado de ello, con frecuencia, las unidades de cuidado clínico prequirúrgico no asignan todos los recursos para controlar y optimizar los niveles de glucosa en sangre antes de la cirugía, tales como los que se pueden obtener por administración intravenosa de insulina. Considerando los riesgos y cargas inherentes en la infusión de insulina, es necesario un enfoque alternativo para el control pre/pos-cirugía de la reacción catabólica al trauma.

La solicitud de patente europea 0 619 332A da cuenta de composiciones que comprenden péptido 1 similar a glucagón (GLP-1) y sus derivados para el tratamiento de diabetes mellitus.

Hawthorne Gillian y otros, *The Effect of laparoscopic cholecystectomy on insulin sensitivity*, Hormone and Metabolic Research, vol. 26, n.º. 10, 1994, págs. 474-477, XP001064516 ISSN:0018-5043, y Svenson, S., y otros, *Glucose and lactate balances in heart and legs after coronary surgery influence of insulin infusion*, Scandinavian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, vol. 23, n.º. 2, 1989, págs. 145-150, XP001064510.0036-5580, dan cuenta del uso de infusiones de insulina para tratar cambios catabólicos posquirúrgicos.

La incretinhormona, péptido 1, similar al glucagón, abreviadamente GLP-1, se procesa a partir del glucagón en el intestino e intensifica la liberación de insulina inducida por nutrientes (Krcymann, B., y otros, *Lancet* 2:1300-1303 (1987)). Son conocidas varias formas truncadas de GLP-1 para estimular la secreción de insulina (acción insulínica) y la formación de AMPc (véase, por ejemplo, Mojsov, S., *Int. J. Peptide Protein Research*, 40:333-343 (1992)). Se ha establecido una relación entre varios experimentos de laboratorio in vitro y respuestas insulínicas mamíferas, en especialmente humanas, a la administración exógena de GLP-1, GLP-1(7-36)amida y ácido GLP-1(7-37), (véase, por ejemplo, Nauck, M.A., y otros, *Diabetología*, 36:741-744 (1993); Gutniak, M., y otros, *New England J. of Medicine*, 326(20):1316-1322 (1992); Nauck, M.A. y otros, *J. Clin. Invest.* 91:301-307 (1993); y Thorens, B., y otros, *Diabetes*, 42:1219-1225 (1993)). La GLP-1(7-36)amida ejerce un efecto antidiabético pronunciado en diabéticos insulínos dependientes por estimular la sensibilidad a la insulina y por intensificar la liberación de insulina inducida por

glucosa a concentraciones fisiológicas (Gutniak, M., y otros, New England J. Med. 326:1316-1322 (1992)). Cuando se administra a diabéticos no insulino-dependientes, la GLP-1(7-36)amida estimula la liberación de insulina, rebaja la secreción de glucagón, inhibe el vaciado gástrico e intensifica la utilización de glucosa. (Nauck, 1993; Gutniak, 1992; Nauck, 1993)).

Se ha obstaculizado el uso de moléculas del tipo de GLP-1 durante una terapia prolongada porque la semivida de tales péptidos es bastante corta. Por ejemplo, GLP-1(7-37)amida tiene una semivida de sólo 3 a 5 minutos. La GLP-1(7-36) amida tiene una semivida de aproximadamente 50 minutos cuando se administra subcutáneamente. Así, estas moléculas de GLP deben administrarse como infusión continua para conseguir un efecto prolongado (Gutniak, M.; y otros, Diabetes Care 17:1039-1044 (1994)). En la presente invención, la corta vida de GLP-1 y la consecuente necesidad de una administración continua no son desventajas porque el paciente típicamente está hospitalizado antes de cirugía y se administran continuamente fluidos antes, durante y después de la cirugía.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un compuesto insulino-trópico seleccionado entre GLP-1(7-37) o un análogo de él que tiene una o más sustituciones, supresiones, inversiones o adiciones de aminoácidos en comparación con GLP-1, y derivados que tienen la secuencia de aminoácidos de GLP-1 o el mencionado análogo de él pero que, adicionalmente tienen una modificación química de sus grupos aminoácidos laterales, átomos de carbono α , grupo aminoterminal o grupo ácido carboxílico terminal, y sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en la atenuación de cambios catabólicos posquirúrgicos.

Breve descripción de los dibujos

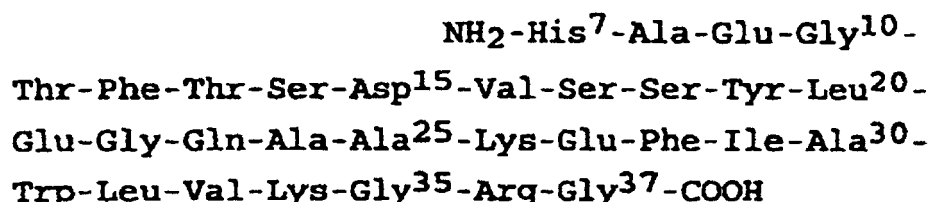
La figura 1 es un gráfico del cambio porcentual de la velocidad de infusión de glucosa (GIR) en el período de fijación posoperatoria (postop) en relación al período de fijación preoperatoria (preop) para seis (6) pacientes de control (o) y siete (7) pacientes receptores de infusión normoglucémica hiperinsulinémica (■) antes de y durante cirugía electiva.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de la infusión continua de GLP-1(7-36)amida sobre la concentración media de glucosa en sangre (mM) (■) en cinco pacientes de diabetes melitus no insulino-dependientes (NIDDM) durante la noche. El gráfico representa también el efecto de una infusión continua de insulina sobre la concentración media de glucosa en sangre (- o -) en los mismos cinco pacientes de NIDDM pero en una noche diferente.

La Figura 3 es un gráfico que muestra el efecto de la infusión de GLP-1 (7-36)amida sobre la concentración media de glucosa en sangre (mM) (■) en cinco pacientes de NIDDM cuando fueron infundidos durante el día, en un período de tres días a partir del comienzo de cada una de las tres comidas. El gráfico representa también el efecto de una inyección subcutánea de insulina sobre la concentración media de glucosa en sangre (- o -) en los mismos cinco pacientes de NIDDM, pero un día diferente, y con inyección inmediatamente antes de cada comida.

Descripción detallada de la invención

“GLP-1” significa GLP-1(7-37). Por costumbre en la técnica, al término amino de GLP-1(7-37) ha sido asignado el número 7 y al término carboxi el número 37. La secuencia de aminoácidos de GLP-1(7-37) es bien conocida en la técnica y se da seguidamente para conveniencia del lector.

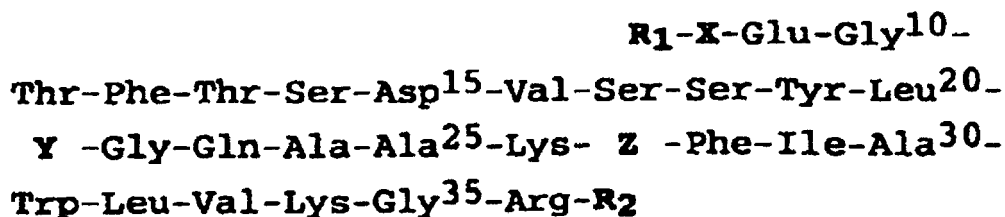


Un “análogo de GLP-1” se define como una molécula que tiene una o varias sustituciones, supresiones, inversiones o adiciones de aminoácidos en comparación con GLP-1. Entre los análogos de GLP-1 conocidos en la técnica están incluidos, por ejemplo, GLP-1(7-34) y GLP-1(7-35), Gln⁹-GLP-1(7-36), D-Gln⁹-GLP-1(7-37), Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1(7-37) y Lys¹⁸-GLP-1(7-37). Los análogos de GLP-1 preferidos son GLP-1(7-34) y GLP-1(7-35), que se describen en la patente U.S. n.º. 5.118.666, y también GLP-1 (7-36), que son formas procesadas biológicamente de GLP-1 que tienen propiedades insulino-trópicas. En la patente U.S. n.º. 5.545.618 se describen otros análogos de GLP-1.

Un “derivado de GLP-1” se define como una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos de GLP-1, o de un análogo de GLP-1, pero que adicionalmente tiene modificación química de uno o varios de sus grupos laterales de aminoácido, átomos de carbono α , grupos terminales amino o grupos terminales ácido carboxílico. Una modificación química incluye, pero no únicamente, la adición de restos químicos, la creación de nuevos enlaces y la eliminación de

restos químicos. Entre las modificaciones de grupos laterales aminoácido están incluidas, no limitativamente, la acilación de grupos ϵ -amino de lisina, N-alquilación de arginina, histidina o lisina, la alquilación de grupos carboxílicos de los ácidos glutámico o aspártico y la desamidación de glutamina o arginina. Entre las modificaciones del grupo terminal amino están incluidas, no limitativamente, las modificaciones desamino, N-alquilo inferior, N-dialquilo inferior, y N-acilo. Entre las modificaciones del grupo terminal carboxi están incluidas, no limitativamente, las modificaciones de amida, alquilo inferior amida, dialquilamida y éster de alquilo inferior. Alquilo inferior es alquilo C₁₋₄. Además, se pueden proteger con grupos protectores conocidos por un químico de cualificación normal uno o varios grupos laterales o terminales. El carbono α de un aminoácido puede ser monometilado o dimetilado.

Un grupo preferido de análogos de GLP-1 para uso en la presente invención está compuesto por moléculas de la fórmula:



(SEC ID no:2)

y sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que R₁ se selecciona entre el grupo constituido por L-histidina, D-histidina, desaminohistidina, 2-amino-histidina, β -hidroxihistidina, homohistidina, alfa-fluorometilhistidina y alfa-metilhistidina; X se selecciona entre el grupo constituido por Ala, Gly, Val, Thr, Ile y alfa-metil-Ala; Y se selecciona entre el grupo constituido por Glu, Gln, Ala, Thr, Ser y Gly; Z se selecciona entre el grupo constituido por Glu, Gln, Ala, Thr, Ser y Gly; y R₂ se selecciona entre el grupo constituido por NH₂ y Gly-OH; con tal que el compuesto tenga un punto isoeléctrico en el intervalo de aproximadamente 6,0 y aproximadamente 9,0 y que, además, cuando R₁ es His, X es Ala, Y es Glu y Z es Glu; R₂ sea NH₂.

Se han descrito numerosos análogos de GLP-1 y derivados de ellos que tienen un punto isoeléctrico en este intervalo y entre ellos están incluidos, por ejemplo,

GLP-1 (7-36)NH₂
 Gly⁸-GLP-1 (7-36)NH₂
 Gln⁹-GLP-1 (7-37)
 D-Gln⁹-GLP-1 (7-37)
 acetyl-Lys⁹-GLP-1 (7-37)
 Thr⁹-GLP-1 (7-37)
 D-Thr⁹-GLP-1 (7-37)
 Asn⁹-GLP-1 (7-37)
 D-Asn⁹-GLP-1 (7-37)
 Ser²²-Arg²³-Arg²⁴-Gln²⁶-GLP-1 (7-37)
 Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)
 Lys¹⁸-GLP-1 (7-37)
 Arg²³-GLP-1 (7-37)
 Arg²⁴-GLP-1 (7-37), y similares (véase, por ejemplo, documento WO 91/11457)

Otro grupo preferido de compuestos activos para uso en la presente invención se describe en el documento WO 91/11457 y está constituido esencialmente por GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36) o GLP-1(7-37), o su amida, y sus sales farmacéuticamente aceptables, que tienen como mínimo una modificación seleccionada entre el grupo constituido por:

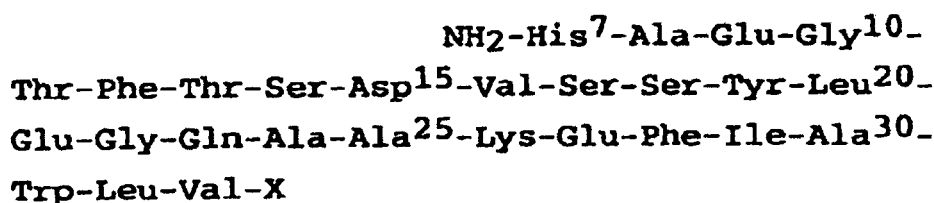
- (a) sustitución de lisina en la posición 26 y/o la posición 34 por glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, arginina o D-lisina; o sustitución de arginina en la posición 36 por glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, lisina o D-arginina;

ES 2 318 861 T3

- (b) sustitución de triptófano en la posición 31 por un aminoácido resistente a la oxidación;
- (c) sustitución de como mínimo una entre valina en la posición 16 por tirosina; serina en la posición 18 por lisina; ácido glutámico en la posición 21 por ácido aspártico; glicina en la posición 22 por serina; glutamina en la posición 23 por arginina; alanina en la posición 24 por arginina y lisina en la posición 26 por glutamina; y
- (d) sustitución que comprende como mínimo una entre: alanina en la posición 8 por glicina, serina o cisteína; ácido glutámico en la posición 9 por ácido aspártico, glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina o fenilalanina; glicina en la posición 10 por serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina o fenilalanina; y ácido aspártico en la posición 15 ácido glutámico por ácido glutámico; y
- (e) sustitución de histidina en la posición 7 por glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina o fenilalanina o la forma D- o N-acilada o alquilada de histidina; pudiendo opcionalmente, en las sustituciones (a), (b), (d) y (e), estar en la forma D los aminoácidos sustituidos, y en la forma N-acilada o N-alquilada los aminoácidos sustituidos en la posición 7.

A causa de que la enzima, dipeptidil-peptidasa IV (DPP IV), puede ser responsable de la rápida inactivación *in vitro* observada del GLP-1 administrado (véase, por ejemplo, Mentlein, R. y otros, Eur. J. Biochem., 214:829-835 (1993)), se prefiere la administración de análogos de GLP-1 y sus derivados que están protegidos de la actividad de DPP IV, y se prefiere más la administración de Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1(7-37)OH, α -metil-Ala⁸-GLP-1(7-36)NH₂ y Gly⁸-Gln²¹-GLP-1(7-36)OH, o sus sales farmacéuticamente aceptables.

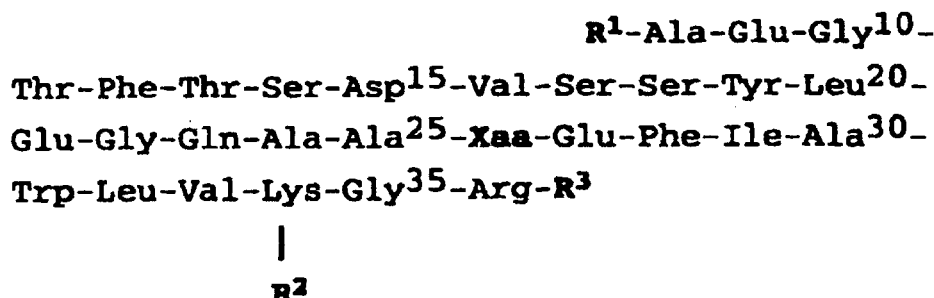
Se prefiere el uso en la presente invención de una molécula reivindicada en la patente U.S. n.º. 5.188.666. Tal molécula se selecciona entre el grupo constituido por un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos:



(SEC. ID no. 3)

en la que X se selecciona entre el grupo constituido por Lys y Lys-Gly; y un derivado del mencionado péptido, seleccionándose el mencionado péptido entre el grupo constituido por: una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mencionado péptido; una sal carboxilato farmacéuticamente aceptable del mencionado péptido; un éster de alquilo inferior farmacéuticamente aceptable del mencionado péptido, y una amida farmacéuticamente aceptable del mencionado péptido seleccionada entre el grupo constituido por amida, alquilo inferior amida y dialquilo inferior amida.

En la presente invención se puede usar otro grupo preferido de moléculas para uso en la presente invención, constituido por compuestos reivindicados en la patente U.S. n.º. 5.512.549 de la fórmula general:



(SEC ID no:4)

y sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que R¹ es selecciona entre el grupo constituido por 4-imidazopropionilo, 4-imidazoacetilo o 4-imidazo- α,α -dimetilacetilo; R² se selecciona entre el grupo constituido por acilo C₅₋₁₀ no ramificado o no está presente; R³ se selecciona entre el grupo constituido por Gly-OH o NH₂; y Xaa es Lys o Arg.

ES 2 318 861 T3

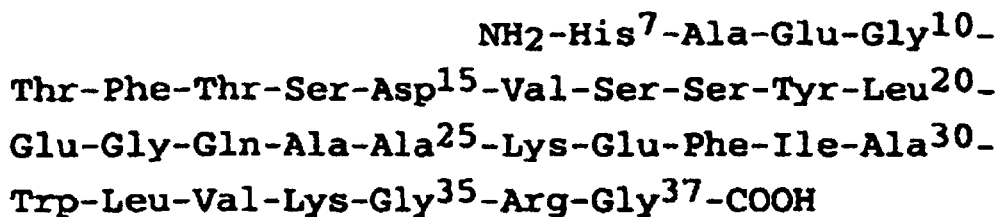
Son compuestos más preferidos de la SEC ID no.4 para uso en la presente invención aquéllos en los que Xaa es Arg y R² es acilo C₆₋₁₀ no ramificado.

Son compuestos altamente preferidos de la SEC ID no.4 para uso en la presente invención aquéllos en los que Xaa es Arg, R² es acilo C₆₋₁₀ no ramificado y R³ es Gly-OH.

Son compuestos más altamente preferidos de la SEC ID no.4 para uso en la presente invención aquéllos en los que Xaa es Arg, R² es acilo C₆₋₁₀ no ramificado, R³ es Gly-OH y R¹ es 4-imidazopropionilo.

Es el compuesto muy preferido de la SEC ID no.4 para uso en la presente invención aquél en el que Xaa es Arg, R² es acilo C₈ no ramificado, R³ es Gly-OH y R¹ 4-imidazopropionilo.

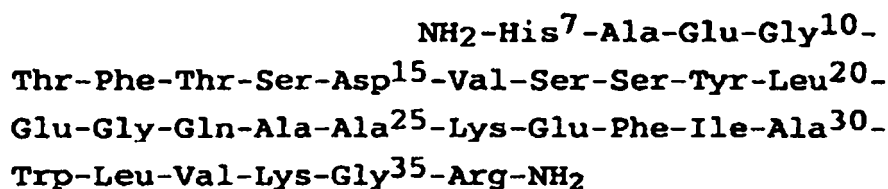
Es altamente preferido el uso en la presente invención de una molécula reivindicada en la patente U.S. n°. 5.120.712. Tal molécula se selecciona entre el grupo constituido por un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos:



(SEC ID no. 1)

y un derivado del mencionado péptido, seleccionándose el mencionado péptido entre el grupo constituido por: una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del mencionado péptido; una sal carboxilato farmacéuticamente aceptable del mencionado péptido; un éster de alquilo inferior farmacéuticamente aceptable del mencionado péptido; y una amida farmacéuticamente aceptable del mencionado péptido seleccionada entre amida, alquil inferior amida y dialquil inferior amida.

Es muy altamente preferido el uso en la presente invención de GLP-1(7-36)amida o una de sus sales farmacéuticamente aceptable. La secuencia de aminoácidos de GLP-1(7-36)amida es:



(SEC ID no: 5)

Los procedimientos para preparar el compuesto activo usado en la presente invención, esto es, GLP-1, un análogo de GLP-1 o un derivado de GLP-1 usado en la presente invención son bien conocidos y se describen en las patentes U.S. n°. 5.118.666, n°. 5.120.712 y n°. 5.523.549.

La porción de aminoácido del compuesto activo usado en la presente invención, o un precursor de él, se prepara por (1) química de síntesis en estado sólido, (2) purificación de moléculas de GLP de fuentes naturales o (3) tecnología recombinante de ADN.

La síntesis química de polipéptidos en fase sólida es bien conocida en la técnica y se puede encontrar en textos generales de este campo tales como *Bioorganic Chemistry*, Dugas, H. y Penney, C., Springer Verlag, New York (1981), págs. 54-92; Merrifield, J.M., *Chem. Soc.* 85:2149 (1962), y *Solid Phase Peptide Synthesis*, Stewart y Young, Freeman, San Francisco (1969) págs. 24-66.

Por ejemplo, la porción de aminoácido se puede sintetizar por metodología en fase sólida utilizando un sintetizador de péptidos 430A (PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA94404) y ciclos de síntesis suministrados por PE-Applied Biosystems. Los BOC-aminoácidos y otros reactivos son adquiribles comercialmente de PE-Applied Biosystems y otras casas suministradoras de productos químicos. A las resinas de p-metilbenzohidrilamina de partida se aplica química secuencial Boc usando protocolos de doble acoplamiento para la producción de

ES 2 318 861 T3

carboxamidas C-terminales. Para la producción de ácidos C-terminales se usa la correspondiente resina de PAM. Se acoplan Asn, Gln y Arg usando ésteres de hidroxibenzotriazol preformados. Se pueden usar los siguientes grupos protectores de cadenas laterales:

5	Arg	tosilo
	Asp	ciclohexilo
10	Glu	ciclohexilo
	Ser	bencilo
15	Thr	bencilo
	Tyr	4-bromo-carbobenzoxi

20 La desprotección de Boc se puede realizar con ácido trifluoroacético en cloruro de metileno. Después de completada la síntesis, los péptidos se pueden desproteger y escindir de la resina con fluoruro de hidrógeno (HF) anhidro que contiene 10% de metacresol. La escisión del (los) grupo(s) protector(es) de las cadenas laterales del péptido de la resina se realiza a entre -5 y +5°C, preferiblemente sobre hielo durante 60 minutos. Después de eliminar el HF, el péptido/resina se lava con éter y el péptido se extrae con ácido acético glacial y se liofiliza.

25 Para preparar el compuesto activo usado en la presente invención se pueden usar técnicas bien conocidas por un experto de cualificación normal en la tecnología recombinante de ADN. De hecho, pueden ser preferibles los procedimientos de ADN recombinantes a causa de su mayor rendimiento. Las etapas básicas en la producción recombinante son:

- 30
- (a) aislamiento de una secuencia natural de ADN que codifica una molécula de GLP-1 o construcción de una secuencia sintética o semisintética codificadora de ADN para una molécula de GLP-1,
 - 35 (b) colocación de la secuencia de codificación en un vector de expresión de manera adecuada para expresar proteínas solas o como proteínas de fusión,
 - (c) transformación de una célula hospedadora eucariótica o procariótica con el vector de expresión,
 - 40 (d) cultivo de la célula hospedadora transformada en condiciones que permitirán la expresión de una molécula de GLP-1 y
 - (e) recuperación y purificación de la molécula de GLP-1 producida recombinantemente.

45 Como se ha señalado previamente, las secuencias de codificación pueden ser totalmente sintéticas o resultado de modificaciones del ADN mayor nativo que codifica glucagón. Una secuencia de ADN que codifica preproglucagón se presenta en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:345-349 (1992), por Lund y otros, y se puede usar como material de partida en una producción semisintética de los compuestos de la presente invención por alteración de la secuencia nativa para conseguir los resultados deseados.

50 Los genes sintéticos cuya transcripción y translación in vitro o in vivo da por resultado la producción de una molécula de GLP-1, se pueden construir por técnicas bien conocidas en la especialidad. Debido a la degeneración natural del código de síntesis, el experto reconocerá que se pueden construir un número considerable pero definido de secuencias de ADN, todas las cuales codifican moléculas de GLP-1.

55 La metodología de la construcción sintética de genes es bien conocida en la técnica. Véase Brown y otros (1997) *Methods in Enzymology*, Academic Press, N.Y., 68:109-151. La secuencia de ADN se diseña desde la secuencia de aminoácido deseada usando el código genético, que puede determinarlo fácilmente un biólogo de cualificación normal. Una vez diseñada, se puede generar la propia secuencia usando un aparato convencional sintetizador de ADN tal como los sintetizadores de ADN modelos 380A o 380 B (PE-Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404).

60 Para expresar la porción de aminoácido de un compuesto usado en la presente invención, se inserta la secuencia sintética de ADN obtenida por ingeniería en uno cualquiera de los vectores de expresión recombinante de ADN apropiados usando endonucleasas de restricción apropiadas. Véase en general Maniatis y otros (1989) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, N.Y., vol. 1-3. Se acoplan ingenierilmente sitios de escisión de endonucleasa de restricción en cualquier extremo de la molécula de GLP-1 que codifica ADN para facilitar el aislamiento de y la integración en vectores de amplificación y expresión bien conocidos en la técnica.

ES 2 318 861 T3

Las endonucleasas particulares empleadas dependerán de la configuración de escisión de endonucleasa de restricción del vector de expresión madre empleado. Los sitios de restricción se seleccionan para orientar apropiadamente la secuencia de codificación con secuencias de control, consiguiéndose así una lectura en marco apropiada y la expresión de la proteína de interés. La secuencia de codificación debe colocarse para que esté en el marco de lectura apropiado con el promotor y el sitio de unión de ribosoma del vector de expresión, siendo ambos funcionales en la célula hospedadora en la que se ha de expresar la proteína.

Para conseguir una transcripción eficiente del gen sintético, éste debe ser operativamente asociado con una región promotora-operadora. Por tanto, la región promotora-operadora del gen sintético se sitúa en la misma orientación secuencial con respecto al codón de partida ATG del gen sintético.

Se conocen en la técnica una variedad de vectores de expresión útiles para transformar células procarióticas y eucarióticas. Véase *The Promega Biological Research Products Catalogue* (1992) (Promega Corp., 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI, 53711-5399); y *The Stratagene Cloning Systems Catalogue* (1992) (Stratagene Corp., 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA (92037)). También, la patente U.S. n.º. 4.710.473 describe vectores circulares de transformación de plásmidos de ADN útiles para expresión de genes exógenos de *E. coli* a altos niveles. Estos plásmidos son útiles como vectores de transformación en procedimientos recombinantes de ADN y

- (a) confieren al plásmido la capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora,
- (b) controlan la replicación autónoma de plásmido en relación a la temperatura a la que se mantienen los cultivos de células hospedadoras,
- (c) estabilizan el mantenimiento del plásmido en poblaciones de células hospedadoras,
- (d) dirigen la síntesis de un producto de proteína indicativo del mantenimiento de plásmido en una población de células hospedadoras,
- (e) proporcionan en serie sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción únicos para el plásmido y
- (f) terminan la transcripción de ARNm.

Estos plásmidos circulares de ADN son útiles como vectores en procedimientos recombinantes de ADN para asegurar niveles altos de expresión de genes exógenos.

Habiendo construido un vector de expresión para la porción de aminoácido de un compuesto usado en la presente invención, la etapa siguiente es poner el vector en una célula adecuada y con ello construir una célula hospedadora recombinante adecuada para expresar el polipéptido. Las técnicas para transformar células con vectores de ADN recombinantes son bien conocidas en la especialidad y se pueden encontrar referencias generales de ellas tales como la de Maniatis y otros, indicada antes. Las células hospedadoras se pueden construir a partir de células eucarióticas o procarióticas.

Generalmente, las células hospedadoras procarióticas producen la proteína a velocidades más altas y son más fáciles de cultivar. Las proteínas expresadas en sistemas de expresión bacteriana a alto nivel se agregan característicamente en gránulos o cuerpos de inclusión, que contienen altos niveles de proteína hiperexpresada. Típicamente, tales agregados de proteína se deben recuperar, solubilizar, desnaturalizar y volver a plegar usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase Kreuger y otros (1990) en *Protein Folding*, Gierasch y King, eds., págs. 136-142, American Association for the Advancement of Science Publication n.º. 89-18S, Washington, y patente U.S. n.º. 4.923.967.

Las alteraciones de una secuencia de aminoácidos de un GLP-1 precursor o análogo de GLP-1 para producir un análogo de GLP-1 o un derivado de GLP-1 deseado se hacen por procedimientos bien conocidos: modificación química, modificación enzimática o una combinación de modificación química y enzimática de precursores de GLP-1. También pueden ser útiles técnicas de los procedimientos clásicos de fase en solución y procedimientos semisintéticos para preparar las moléculas de GLP-1 usadas en la presente invención. Los procedimientos para preparar las moléculas de GLP-1 de la presente invención son bien conocidos por un químico experto en péptidos de cualificación normal.

La adición de un grupo acilo al grupo ϵ -amino de Lys³⁴ se puede realizar usando uno cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Véase Bioconjugate Chem., *Chemical Modifications of Proteins: History and Applications*, págs. 1, 2-12 (1990) y Hashimoto y otros, *Pharmaceutical Res.* 6(2):171-176 (1989).

Por ejemplo, se puede añadir un éster de N-hidroxisuccinimida de ácido octanoico a la lisil- ϵ amina usando acetonitrilo al 50% en tampón de borato. El péptido se puede acilar antes o después de añadir el grupo imidazólico. Además, si el péptido se prepara recombinantemente, es posible la acilación antes de la escisión enzimática. También, la lisina del derivado de GLP-1 se puede acilar como se propugna en el documento WO 96-29342.

Se ha descrito en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes U.S. n.º. 5.120.712 y n.º. 5.118.666, y Orskow, C., y otros, *J. Biol. Chem.*, 264(22):12826-12829 (1999) y documento WO 91/11457 (Buckley, D.L., y otros, publicado el

6 de agosto de 1991)) la existencia y preparación de una multitud de análogos y derivados funcionales, no protegidos, parcialmente protegidos, naturales y no naturales, de moléculas de GLP-1(7-36)amida y GLP-1(7-37).

Opcionalmente, se pueden proteger los restos de aminoácidos aminoterminales y carboxiterminales de derivados de GLP-1 u, opcionalmente, se protege uno de los términos. Las reacciones de formación y eliminación de tales grupos protectores se describen en obras estándar, por ejemplo, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, London y New York (1973); Green, T.H., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, New York (1981); y *The Peptides*, vol. 1, Schröder y Lübke, Academic Press London y New York, (1965). Entre los grupos representativos protectores de amino están incluidos, por ejemplo, formilo, acetilo, isopropilo, butoxicarbonilo, fluorofenilmetoxycarbonilo, carbobenciloxi y similares. Entre los grupos protectores de carboxi representativos están incluidos, por ejemplo, éster de bencilo, éster de metilo, éster de etilo, éster de t-butilo, éster de p-nitrofenilo y similares.

Los derivados de GLP-1 carboxiterminales de éster de alquilo inferior usados en la presente invención se preparan haciendo reaccionar el alcohol C₁₋₄ deseado con el polipéptido deseado en presencia de un ácido catalítico tal como ácido clorhídrico. Las condiciones apropiadas para esta formación de éster de alquilo incluyen una temperatura de reacción de aproximadamente 50°C y un tiempo de reacción de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 3 horas. Análogamente se pueden formar derivados éster de alquilo de los restos Asp y/o Glu.

La preparación de un derivado carboxamida de un compuesto usado en la presente invención se realiza, por ejemplo, como describen Stewart, J.M. y otros, en *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company Press, 1984.

En la presente invención se puede usar una forma de sal farmacéuticamente aceptable de GLP-1, de un análogo de GLP-1 o de un derivado de GLP-1. Los ácidos comúnmente empleados en forma de sales de adición de ácido son ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenilsulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético y similares. Entre los ejemplos de tales sales están incluidas las sales sulfato, piro sulfato, piro sulfato, bisulfato, sulfato, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, hexino-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, γ -hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato, y similares. Las sales de adición de ácido preferidas son las formadas con ácidos minerales tales como ácido clorhídrico y ácido bromhídrico, especialmente ácido clorhídrico.

Entre las sales de adición de base están incluidas las de bases inorgánicas tales como hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos y similares de amonio o metales alcalinos y alcalinotérreos. Entre estas sales útiles en la preparación de las sales de esta invención están incluidos, por tanto, hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido amónico, carbonato potásico y similares. Son especialmente preferidas las formas de sales.

Un GLP-1, análogo de GLP-1 o derivado de GLP-1 usado en la presente invención se puede formular con uno o varios excipientes antes del uso en la presente invención. Por ejemplo, el compuesto activo usado en la presente invención puede complejarse con un catión metálico divalente por procedimientos bien conocidos. Entre tales cationes metálicos están incluidos, por ejemplo, Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Fe⁺⁺, Co⁺⁺, Cd⁺⁺, Ni⁺⁺ y similares.

Opcionalmente, el compuesto activo usado en la presente invención puede combinarse con un tampón farmacéuticamente aceptable y ajustar el pH para obtener una estabilidad aceptable y un pH aceptable para administración parenteral.

Opcionalmente se pueden añadir uno o varios agentes antimicrobianos farmacéuticamente aceptables. Los agentes antimicrobianos farmacéuticamente aceptables preferidos son metacresol y fenol. Para ajustar la fuerza iónica o tonicidad se pueden añadir una o varias sales farmacéuticamente aceptables. Para ajustar además la isotonicidad de la formulación se pueden añadir uno o varios excipientes. La glicerina es un ejemplo de un excipiente para ajustar la isotonicidad.

La administración se puede realizar por cualquier vía que es conocida como eficaz por un médico de cualificación normal. Se prefiere la administración parenteral. Comúnmente, se entiende en la bibliografía la administración parenteral como la inyección de una forma de dosificación en el cuerpo mediante una jeringa estéril u otro dispositivo mecánico tal como una bomba de infusión. Las vías parenterales incluyen la intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intracerebroventricular, intraarterial, subaracnoide y epidural. Las vías de administración más preferidas de los compuestos usados en la presente invención son la intravenosa, intramuscular y subcutánea. Las vías de administración de los compuestos usados en la presente invención muy preferidas son la vía intravenosa y la subcutánea. Para la administración parenteral, preferiblemente, un compuesto activo de la presente invención se combina con agua destilada a un pH apropiado.

Para controlar la duración de la acción, se pueden emplear procedimientos farmacéuticos adicionales. Se pueden producir preparados de liberación controlada usando polímeros para complejar o absorber el compuesto activo usado en la presente invención. Se puede obtener una duración prolongada seleccionando macromoléculas apropiadas, por

ejemplo, poliésteres, poliaminoácidos, polivinilpirrolidona, acetato de etilvinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o sulfato de protamina, y seleccionando la concentración de macromoléculas, así como los procedimientos de incorporación con el fin de prolongar la liberación. Otro posible procedimiento para prolongar la duración de acción de preparados de liberación controlada es incorporar un compuesto activo usado en la presente invención en partículas de un material polímero tal como poliésteres, poliaminoácidos, hidrogeles, poli(ácido láctico) o copolímeros de etileno/acetato de vinilo. Alternativamente, en vez de incorporar un compuesto en estas partículas polímeras, es posible atrapar un compuesto usado en la presente invención en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coapilamiento o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina, respectivamente, o en sistemas coloidales de suministro de fármacos, por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas, o en macroemulsiones. Tales cuestiones se consideran an *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1980).

De acuerdo con las enseñanzas de esta invención, un paciente necesita los compuestos usados en la presente invención durante aproximadamente 1-16 horas antes de realizar la cirugía en el mencionado paciente, durante la cirugía en el mencionado paciente y después de la mencionada cirugía en el paciente durante un período de no más de aproximadamente 5 días.

Como se ha mencionado antes, el momento antes de la cirugía para comenzar a administrar los compuestos usados en la presente invención es de aproximadamente 16 horas a aproximadamente 1 hora antes de comenzar la cirugía. El momento antes de comenzar la cirugía en el que se deben administrar los compuestos de la presente invención con el fin de reducir los efectos catabólicos y la resistencia a la insulina dependerá de factores cuyos efectos son conocidos por un médico de cualificación normal y entre ellos están de forma muy importante, si el paciente ayunó o recibió una infusión o bebida de glucosa o alguna otra forma de alimento durante el período de preparación antes de la cirugía y, también, sin limitación, el sexo del paciente, su peso y edad, la importancia de cualquier incapacidad para regular la glucosa en sangre, las causas subyacentes de cualquier incapacidad para regular la glucosa en sangre, la gravedad esperada del trauma causado por la cirugía, la vía de administración y la biodisponibilidad, la persistencia en el cuerpo, la formulación y la potencia del compuesto administrado. Un intervalo de tiempo preferido dentro del cual se comienza a administrar los compuestos usados en la presente invención es de aproximadamente una hora a aproximadamente 10 horas antes de comenzar la cirugía. El intervalo muy preferido para comenzar a administrar los compuestos es de entre 2 horas y 8 horas antes de comenzar la cirugía.

Como se ha explicado antes en esta memoria, la resistencia a la insulina tras un tipo particular de cirugía, cirugía abdominal programada, es muy profunda el primer día posoperatorio, dura como mínimo 5 días y puede tardarse hasta tres semanas en normalizarse. (Thorell, A., y otros 1993)). Así, el paciente posoperatorio puede necesitar que se le administren los compuestos de la presente invención después del trauma quirúrgico durante un tiempo que dependerá de factores que el médico de cualificación normal comprenderá y determinará. Entre estos factores están si el paciente ha estado en ayunas o ha recibido una infusión o bebida de glucosa, alguna otra forma de alimento después de la cirugía y, también, sin limitación, el sexo del paciente, su peso y edad, la importancia de cualquier incapacidad para regular la glucosa en sangre, las causas subyacentes de cualquier incapacidad para regular la glucosa en sangre, la gravedad real del trauma causado por la cirugía, la vía de administración y la biodisponibilidad, la persistencia en el cuerpo, la formulación y la potencia del compuesto administrado. La duración preferida para la administración de los compuestos usados en la presente invención es de no más de 5 días después de la cirugía.

El término "cambios catabólicos posquirúrgicos" es bien conocido por un cirujano de cualificación normal (Shaw, J.H.F. y otros, *Ann. Surg.* (1989); Little, R.A., y otros (1987); Frayn, K.N. (1986); Brandi, L., y otros (1983)) y se define en este contexto como el estado de metabolismo causado por el trauma quirúrgico que se puede caracterizar por uno o varios de los fenómenos siguientes: balance negativo de nitrógeno, con pérdidas de nitrógeno corporal (Wernerman, J. y otros, *J. Parent. Enter. Nutr.* 10:578-82 (1986); Tashiro, T. y otros. *J. Parent. Enter. Nutr.* 9:452-5 (1985)); utilización periférica de grasa con preferencia a glucosa con reducción del cociente respiratorio (Frayn, K.N., y otros, *Arch. Emerg. Med.* 4:91-9 (1987); Stjernstrom, H., y otros, *Clin. Physiol.* 1:59-72 (1981)) y producción endógena de glucosa a expensas de proteína corporal y reservas de energía a pesar de hiperglicemia (Gump, F.E., y otros, (1974); Black, R.B., y otros (1982); Frayn, K.N., y otros (1987); Frayn, K.N., y otros, *Br. Med. Bull.* 41(3):232-9(1985)).

El término "resistencia a la insulina" es también conocido por los médicos de cualificación normal y se define en este contexto como una afección fisiológica en la que concentraciones normales de insulina provocan respuestas menores que normales. La resistencia a la insulina puede ser debida a una disminución de la unión de la insulina a receptores de superficie, o a alteraciones en el metabolismo intracelular. El primer tipo, caracterizado como una disminución de la sensibilidad a la insulina, típicamente se puede superar aumentando la concentración de insulina. El segundo tipo, caracterizado como una disminución de la receptividad de insulina, no se puede superar con cantidades grandes de insulina. La resistencia a la insulina después de traumas se puede superar con dosis de insulina que son proporcionales al grado de resistencia a la insulina y, por ello, aparentemente está causada por una disminución de la sensibilidad a la insulina (Brandi, L.S., y otros, *Clin. Science* 79:443-450 (1990); Henderson, A.A., y otros, *Clin. Sci.* 80:25-32 (1990)). La reducción de la sensibilidad a la insulina después de cirugía abdominal electiva dura como mínimo 5 días, pero no más de tres semanas, y es muy profunda el primer día después de la operación, pudiendo tardar hasta tres semanas hasta que se normalice (Thorell, A., y otros, (1993)). No se conocen bien las causas de la resistencia transitoria a la insulina observada.

ES 2 318 861 T3

La dosis de GLP-1, análogo de GLP-1 o derivado de GLP-1 eficaz para normalizar el nivel de glucosa en sangre de un paciente dependerá de varios factores, entre los que están incluidos, no limitativamente: el sexo del paciente, su peso y su edad, la gravedad de la incapacidad para regular la glucosa en sangre, las causas subyacentes de la incapacidad para regular la glucosa en sangre, de si se suministra simultáneamente glucosa u otra fuente de carbohidratos, la vía de administración y la biodisponibilidad, la persistencia en el cuerpo, la formulación y la potencia. Cuando la administración es continua, una velocidad de dosificación adecuada es de entre 0,25 y 6 pmol/kg de peso corporal/min, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,2 pmol/kg/min. Cuando la administración es intermitente, la dosis a administrar debe fijarse teniendo en cuenta el intervalo entre dosis, la biodisponibilidad de GLP-1, análogo de GLP-1 o derivado de GLP-1 y el nivel necesario para tener una glucosa en sangre normal. Corresponde al saber de un médico de cualificación normal establecer la dosis y la velocidad de administración de GLP-1, análogo de GLP-1 o derivado de GLP-1. para conseguir el resultado clínico deseado.

La presente invención se entenderá más fácilmente por referencia a ejemplos específicos que se aportan para ilustrar la invención.

Ejemplo 1

En el estudio participaron 13 pacientes programados para cirugía ortopédica programada (artroplastia de cadera). Ninguno de los pacientes tenía historia o señales de enfermedad metabólica, afección hepática o diabetes mellitus. En los trece pacientes, los niveles de glucosa en sangre en ayunas y los ensayos de CRP y de hígado (bilirrubina, fosfatasa alcalina, AST y ALT) eran normales.

Se estudiaron 7 pacientes (grupo de insulina, edad 56 ± 5 años; IMC 25 ± 1 kg/m²) comenzando a las 08,00 h después de ayuno durante la noche. Después de un período basal inicial, tiempo durante el cual se tomaron muestras para la medida de glucosa en sangre y hormonas, se realizó durante 30 min calorimetría indirecta y se infundió insulina (Actrapid®, Novo, Copenhague) intravenosamente a una velocidad constante de 0,6 ng/kg/s (36 ng/kg/min o 0,8 mU/kg/min) mientras que se dio una infusión intravenosa variable de glucosa (200 mg/ml) para mantener glucosa en sangre a un nivel constante (4,5 mM). Después de una hora en condiciones de estado estacionario, todos los pacientes se sometieron a tratamiento quirúrgico normalizado (artroplastia de cadera). La operación comenzó a los 290 ± 23 minutos después de comenzar la infusión de insulina. La fijación hiperinsulinémica, normoglicémica se mantuvo luego durante la cirugía y continuó 3-4 horas después de la cirugía. Los datos se presentarán de acuerdo con la nomenclatura siguiente:

basal:	30 min antes de iniciar la infusión de insulina
fijación preop:	fijación hiperinsulinémica, normoglicémica, 60 min antes de cirugía
op. temprana:	de 10 a 40 min después de iniciar la cirugía
op. tardía:	los últimos 30 min de cirugía
fijación posop:	fijación hiperinsulinémica, normoglicémica, en estado estacionario durante 60 min, que se inicia 143,30 mi después de iniciar la cirugía.

Un segundo grupo de pacientes (grupo de control, n = 6, edad 59 ± 3 años; IMC 26 ± 1 kg/m²), aparejado en la edad y el IMC con el grupo de insulina, recibió el mismo protocolo preoperatorio (fijación basal y preop) 7 días antes de cirugía. El grupo de control no recibió fijación basal o preop el día de la cirugía. Sin embargo, inmediatamente después de cirugía, cada paciente del grupo de control fue infundido con insulina, 0,6 ng/kg/s (36 ng/kg/min o 0,8 mU/kg/min) y se inició una fijación hiperinsulinémica, normoglicémica (4,5 mM) (posop).

Se realizó calorimetría indirecta (Deltatrac® Dansjö, Suecia) (Frayn, K.N., J. Appl. Physiol. 55(2): 628-34 (1983); Takala J., y otros, Crit. Care Med. 17(10); 1041-47(1989) durante la fase basal, dos veces durante la cirugía (op temprana y op tardía) y durante los últimos 30 minutos de las fijaciones preop y posop. Se realizó muestreo a tiempo para análisis de la excreción de urea en orina. Después de correcciones por el tamaño del depósito de urea (Tappy, L. y otros, Diabetes 37:1212-16 (1988)) se calcularon las velocidades de gasto de energía no proteínica (EE), cocientes respiratorios (RQ) y oxidación del sustrato.

Las muestras de sangre se recogieron de una vena de la mano calentada repetidamente durante los períodos basal, preop, op temprano, op. tardío y posop. La glucosa en sangre se midió inmediatamente después de recoger la muestra usando el procedimiento de glucosa oxidasa (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, Ohio) (Hugget, A.S., y otros, Lancet 2:368-70 (1957)). Para medir las concentraciones de insulina en suero se usaron radioinmunoensayos (RIE) (Grill, V., y otros, Metabolism 39:251-58 (1990)); Péptido c (Novo Research, Bagsværd, Dinamarca), cortisol (Harris, V., y otros, en *Methods of hormone radioimmunoassay*, Jaffe, B.M. & Behrman, H.R., eds., Academic Press, New York & London (1979) págs. 643-56) y glucagón (Euro-Diagnostics AB, Malmd, Suecia) (Faloona, G.R., y otros, *Glucagon radioimmunoassay technique*, vol. 1: Academic Press, New York (1974)).

ES 2 318 861 T3

Todos los valores son valores individuales o valores medio \pm SEM (error estándar de la media). Se acepta significado estadístico a $p < 0,05$ usando el ensayo de rango firmado de Wilcoxon y el ensayo en U de Mann-Whitney para datos emparejados y no emparejados, respectivamente. A causa de que los niveles de insulina en suero tendían a ser más bajos en la fijación posop en el grupo de control en comparación con el grupo de insulina ($p = 0,06$), las GIR durante las fijaciones se corrigieron también a los niveles de insulina predominantes dividiendo GIR y el nivel medio de insulina en suero durante los períodos de 60 min en estado estacionario.

Los niveles de insulina en suero eran similares para los dos grupos en las fijaciones basal y durante la preop. En el grupo de insulina, los niveles de insulina permanecían en torno a 2,7 ng/ml (60 μ U/ml) durante la cirugía y la fijación posop. En el grupo de control, los niveles de insulina permanecían inalterados en comparación con los niveles basales durante la cirugía. Los niveles de insulina en la fijación posop del grupo de control no eran significativamente diferentes de los niveles durante la fijación preop ni eran diferentes de los del grupo de insulina durante la fijación posop.

Los niveles de Péptido c (Tabla I) eran similares entre los grupos en el período basal y durante las fijaciones preop y posop. El grupo de insulina presentaba unos niveles de Péptido c más bajos durante la cirugía en comparación con el grupo de control.

Los niveles de glucagón en suero disminuían ($p < 0,05$) después de cirugía en ambos grupos (Tabla I). Sin embargo, el cambio relativo después de cirugía (% frente a preop) era más alto en el grupo de insulina ($p < 0,01$ frente a control).

Los niveles de cortisol en suero (Tabla I) disminuían después de cirugía en el grupo de insulina mientras que, en el grupo de control, tendían a aumentar ($p = 0,1$). Los niveles posoperatorios de cortisol eran más bajos en el grupo de insulina en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$).

Las velocidades de oxidación de glucosa y grasa eran similares entre los grupos antes de cirugía. Durante la cirugía, las velocidades de oxidación de la glucosa eran significativamente más altas, mientras que las velocidades de oxidación de la grasa eran significativamente más bajas en el grupo de insulina ($p < 0,05$ frente a control). En la fijación posop no se pudo encontrar cambio alguno en las velocidades de oxidación del sustrato en el grupo de insulina en comparación con la fijación preop. El gasto de energía residual (EE) no era diferente entre los grupos durante o después de cirugía y quedaba igual en ambos grupos después de la cirugía en comparación con la fijación preop.

Los niveles de glucosa en ayunas eran similares entre los grupos de insulina y de control. Se mantuvo normoglicemia en el estado transitorio durante la infusión de insulina, lo que daba por resultado coeficientes intraindividuales medios de variación de glucosa de 4,6% en el grupo de control y de 6,2% en el grupo de insulina.

Estos hallazgos demuestran de forma concluyente que los pacientes sometidos a cirugía electiva desarrollan en estado de ayuno resistencia posoperatoria a la insulina y aumento de la oxidación de grasa. Además, estos hallazgos demuestran también por vez primera que se eliminan completamente los cambios catabólicos después de cirugía y se atenúa completamente la respuesta hormonal a la tensión si los pacientes entran en tensión quirúrgica en un estado de elevados niveles de insulina que se mantiene a lo largo de la operación.

Ejemplo 2

Se administró GLP-1 (7-36)amida por infusión subcutánea a una velocidad de la dosis de 1,2 pmol/kg/h durante 10 horas por la noche, a 5 pacientes que tenían diabetes no insulino dependiente (NIDDM). Como control se infundió continuamente insulina en los mismos 5 pacientes pero en día diferente al de infusión de la GLP-1(7-36)amida. La velocidad de infusión de insulina se ajustaba cada 2 horas para conseguir un control óptimo y evitar hipoglucemia. Como lo demuestran los datos de la Tabla II y la Figura 2, la infusión subcutánea de GLP-1 (7-36)amida casi normaliza la glucosa en sangre sin inducir hipoglucemia en ninguno de los pacientes. El control metabólico con GLP-1(7-36) amida era mejor que el conseguido con insulina y el nivel medio de glucosa en sangre era inferior para el tratamiento con GLP-1(7-36)amida que el control con una cantidad estadísticamente significativa a las 23.00, 0,00 y 1,00 horas.

ES 2 318 861 T3

TABLA II

Niveles medios de glucosa en sangre para 5 pacientes de NIDDM infundidos continuamente durante 10 horas por la noche con GLP-1(7-36)amida. En un estudio de control con los mismos pacientes en día diferente se administró insulina por infusión continua

Hora	Infusión de GLP-1		Infusión de insulina (control)	
	Media de glucosa en sangre (mM)	Error estándar (mM)	Media de glucosa en sangre (mM)	Error estándar (mM)
21,00	7,5	0,45	6,9	0,68
22,00	5,4	0,76	6,6	0,55
23,00	4,5	0,16	5,9	0,98
0,00	4,4	0,23	5,6	0,90
1,00	4,4	0,29	5,1	0,58
2,00	4,8	0,34	5,2	0,58
3,00	5,2	0,41	5,4	0,30
4,00	5,4	0,41	5,7	0,25
5,00	5,8	0,41	6,0	0,30
6,00	6,0	0,45	6,1	0,38
7,00	6,2	0,45	6,1	0,33

Ejemplo 3

Se infundió durante el día GLP-1(7-36)amida en 5 pacientes de NIDDM durante tres horas al desayunar, almorzar y cenar. Las horas a que se infundió eran 7,30-10,30 (desayuno), 10,30-1,30 (almuerzo) y 4,30-7,30 (cena), como se indica en la Figura 3. En un experimento de control con los mismos pacientes de NIDDM realizado en un día diferente, se inyectó insulina subcutáneamente justo antes de comenzar las comidas, como se indica en la Figura 3. Mientras que se infundía GLP-1, se eliminaron las fluctuaciones de glucosa postprandial observadas con la inyección de insulina y se mantuvieron niveles normales de glucosa en sangre. Inmediatamente después de terminar cada infusión de GLP-1 (7-36)amida, el nivel de glucosa en sangre aumentó significativamente. No se observó efecto perjudicial secundario alguno de la GLP-1(7-36)amida. Estos datos indican que la infusión de GLP-1(7-36)amida controla más eficazmente los niveles de glucosa postprandial que la inyección de insulina y que el control es eficaz mientras que se continúa infundiendo GLP-1(7-36) amida.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 318 861 T3

TABLA III

Niveles medios de glucosa en sangre para 5 pacientes NIDDM infundidos con GLP-1(7-36)amida durante 3 horas comenzando al iniciar cada comida. En un estudio de control con los mismos pacientes en día diferente se administró insulina por infusión continua justo antes de cada comida. Las comidas se iniciaron a las 7,30, 10,30 y 4,30 horas

Hora	Infusión de GLP-1		Infusión de insulina (control)	
	Media de glucosa en sangre (mM)	Error estándar (mM)	Media de glucosa en sangre (mM)	Error estándar (mM)
7,00	5,4	0,35	6,1	0,41
8,00	4,9	0,38	7,0	0,51
9,00	5,7	0,59	9,1	0,74
10,00	5,8	1,06	9,9	0,78
11,00	8,1	0,94	8,2	0,76
12,00	9,4	0,59	6,5	0,74
13,00	7,2	1,18	9,1	0,90
14,00	5,3	1,21	8,1	0,91
15,00	7,2	0,71	7,0	0,87
16,00	10,4	0,26	7,2	0,57
17,00	9,2	1,06	6,5	0,59
18,00	5,7	1,59	7,3	0,65
19,00	6,6	0,94	6,1	0,59
20,00	8,3	0,71	6,0	0,41
21,00	9,3	0,71	6,4	0,44

REIVINDICACIONES

5 1. Un compuesto insulínico seleccionado entre GLP-1(7-37) o un análogo de él que tiene una o más sustituciones, supresiones, inversiones o adiciones de aminoácidos en comparación con GLP-1, y derivados que tienen la secuencia de aminoácidos de GLP-1 o el mencionado análogo de él pero que, adicionalmente tienen una modificación química de sus grupos aminoácidos laterales, átomos de carbono α , grupo aminoterminal o grupo ácido carboxílico terminal, y sus sales farmacéuticamente aceptables, para uso en la atenuación de cambios catabólicos posquirúrgicos.

10 2. Un compuesto insulínico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cambio catabólico posquirúrgico es hiperglucemia.

15 3. Un compuesto insulínico de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el péptido se administra para normalizar niveles de glucosa en sangre.

4. Un compuesto insulínico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el mencionado análogo está acilado en el grupo épsilon-amino de un resto de lisina.

20 5. Un compuesto insulínico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el mencionado análogo es resistente a la actividad de la dipeptidilpeptidasa.

25 6. Un compuesto insulínico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, seleccionado entre GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36) o GLP-1(7-37). o su forma amida, y sus sales farmacéuticamente aceptables, que tiene como mínimo una modificación seleccionada entre:

(a) sustitución de lisina en la posición 26 y/o la posición 34 por glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, arginina o D-lisina; o sustitución de arginina en la posición 36 por glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, lisina o D-arginina;

30 (b) sustitución de triptófano en la posición 31 por un aminoácido resistente a la oxidación;

35 (c) sustitución de como mínimo una entre valina en la posición 16 por tirosina; serina en la posición 18 por lisina; ácido glutámico en la posición 21 por ácido aspártico; glicina en la posición 22 por serina; glutamina en la posición 23 por arginina; alanina en la posición 24 por arginina y lisina en la posición 26 por glutamina; y

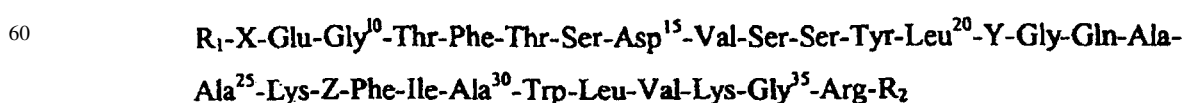
40 (d) sustitución que comprende como mínimo una entre: alanina en la posición 8 por glicina, serina o cisteína; ácido glutámico en la posición 9 por ácido aspártico; glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina o fenilalanina; glicina en la posición 10 por serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina o fenilalanina; y ácido aspártico en la posición 15 ácido glutámico por ácido glutámico; y

45 (e) sustitución de histidina en la posición 7 por glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina o fenilalanina o la forma D- o N-acilada o alquilada de histidina,

50 pudiendo opcionalmente, en las sustituciones (a), (b), (d) y (e), estar en la forma D los aminoácidos sustituidos, y en la forma N-acilada o N-alquilada los aminoácidos sustituidos en la posición 7.

55 7. Un compuesto insulínico de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los mencionados GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36), GLP-1(7-3,7) o su forma amida y sus sales farmacéuticamente aceptables están modificados por la sustitución de lisina en la posición 26 y/o la posición 34 por glicina, serina, cisteína, treonina, asparagina, glutamina, tirosina, alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, arginina o D-lisina lisina.

8. Un compuesto insulínico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, compuesto que tiene la fórmula:



65 y sus sales farmacéuticamente aceptables,

ES 2 318 861 T3

en la que

R₁ se selecciona entre L-histidina, D-histidina, desaminohistidina, 2-amino-histidina, β-hidroxihistidina, homohistidina, alfa-fluorometilhistidina y alfa-metilhistidina;

5

X se selecciona entre Ala, Gly, Val, Thr, Ile y alfa-metil-Ala;

Y se selecciona entre Glu, Gln, Ala, Thr, Ser y Gly;

10

Z se selecciona entre Glu, Gln, Ala, Thr, Ser y Gly; y

R₂ se selecciona entre NH₂ y Gly-OH; con tal que el compuesto tenga un punto isoeléctrico en el intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 9,0 y que, además, cuando R₁ es His, X es Ala, Y es Glu y Z es Glu, R₂ sea NH₂.

15

9. Un compuesto insulínico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el mencionado análogo se selecciona entre GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36) y sus sales farmacéuticamente aceptables.

20

10. Un compuesto insulínico de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la mencionada molécula se selecciona entre Gly⁸-GLP-1(7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1-(7-37)OH, alfa-metil-Ala⁸-GLP-1(7-36)NH₂ y Gly⁸-Gln²¹-GLP(7-36)OH, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

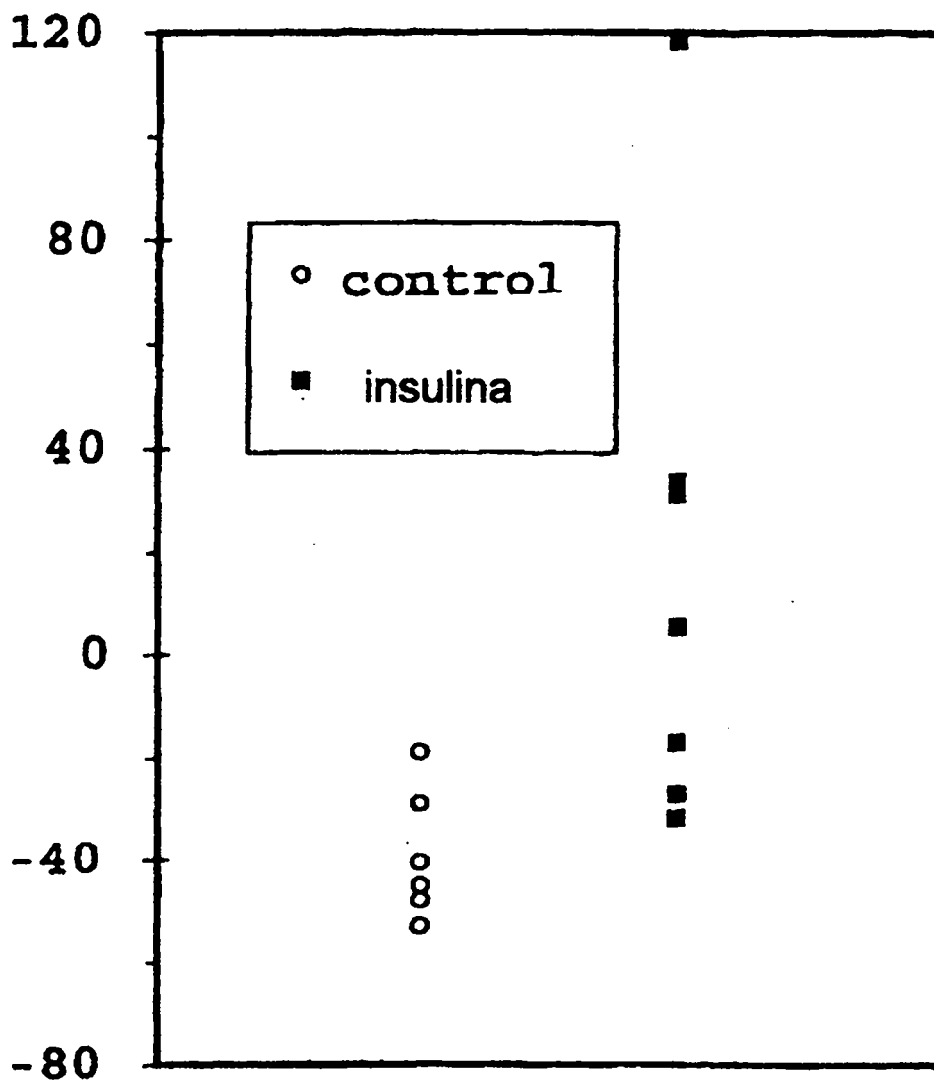


FIG. 2

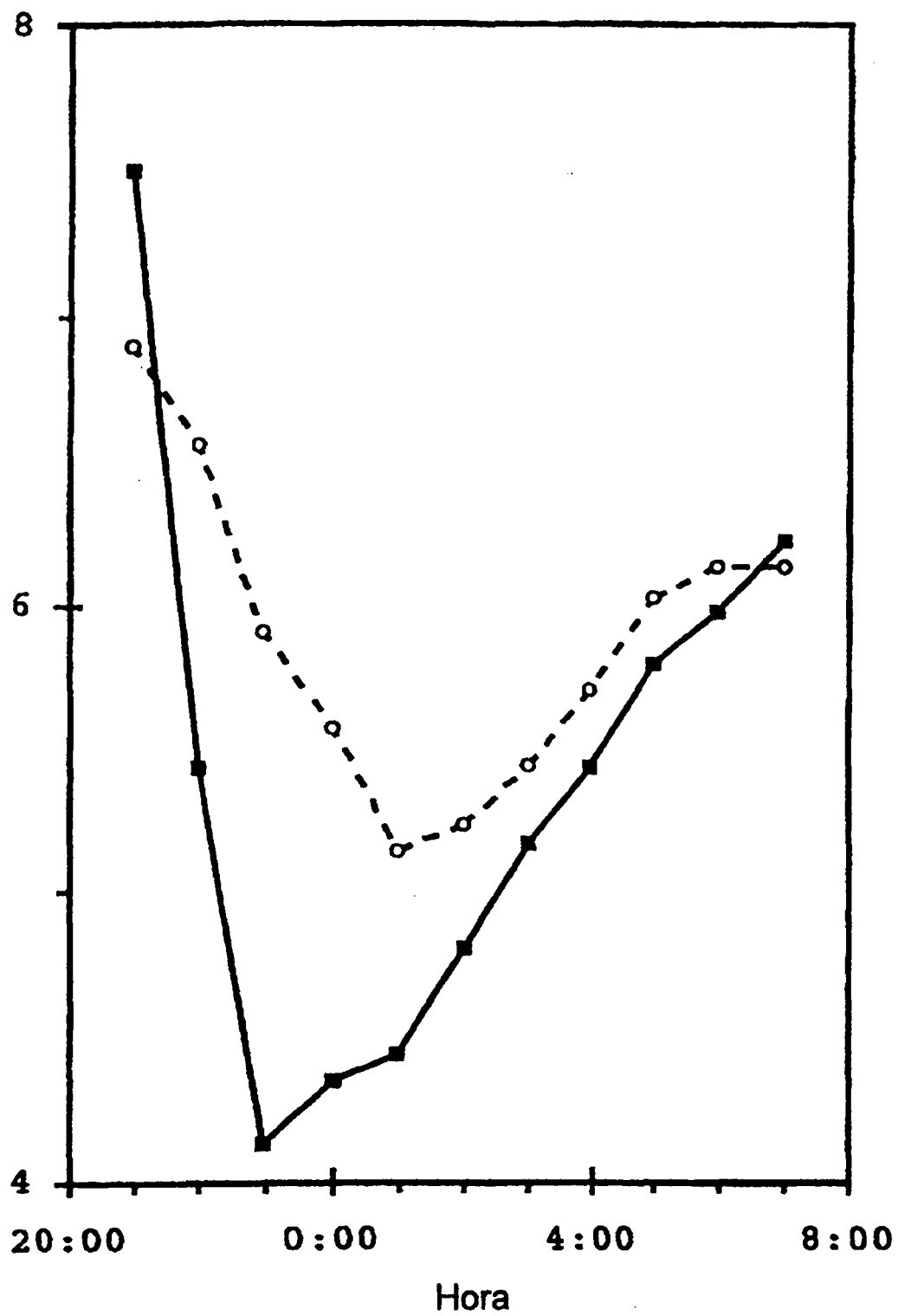


FIG. 3

