



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 630**

51 Int. Cl.:

A61P 3/10 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/426 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01927848 .0**

96 Fecha de presentación : **02.04.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1283735**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.02.2003**

54 Título: **Método para la mejora de la señalización de los islotes en diabetes mellitus y para su prevención.**

30 Prioridad: **31.03.2000 US 194061 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.05.2009

73 Titular/es: **Prosidion Limited**
Windrush Court Watlington Road
Oxford, OX4 6LT, GB

72 Inventor/es: **Demuth, Hans-Ulrich y**
Glund, Konrad

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 320 630 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

Método para la mejora de la señalización de los islotes en diabetes mellitus y para su prevención.

5 Antecedentes

El páncreas comprende dos tejidos glandulares: uno es una colección de células que forman la función exocrina del páncreas, en el que estas células exocrinas sintetizan y liberan enzimas digestivas en el intestino; el segundo tejido comprende la función endocrina del páncreas, que sintetiza y libera hormonas en la circulación. De importancia primordial en la función endocrina del páncreas son las células β . Estas células sintetizan y segregan la hormona insulina. La hormona insulina desempeña un papel vital manteniendo niveles glucémicos fisiológicos normales. Existen moléculas que son efectoras de las células endocrinas del páncreas. Las incretinas son un ejemplo de tales moléculas. Las incretinas potencian la secreción de insulina, inducida por glucosa, desde el páncreas.

Se ha demostrado que las incretinas tales como el péptido-1 (7-36)amida similar a glucagón ("GLP-1"; o el análogo de lagarto extendida-4) y el polipéptido inhibidor gástrico ("GP") son insulínótropicos, es decir, su presencia o estabilización puede mantener un control glucémico agudo mediante sus efectos secretores de insulina (Demuth, H.U., *et al.*, DE 196 16 486:1-6, 1996, Pauly, R.P. *et al.*, Regul. Pept. 64 (1-3):148, 1996, cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia en su totalidad). Adicionalmente, se ha demostrado que GLP-1 actúa como una hormona del crecimiento de los islotes estimulando la proliferación de células β , el incremento de la masa celular y promoviendo la diferenciación de las células pancreáticas no diferenciadas en células especializadas de los islotes de Langerhans. Tales células muestran una secreción mejorada de insulina y glucagón (Yaekura, K. *et al.*, IN:VIP,PACAP, and Related Peptides, W.G. Forssmann y S.I. Said (eds.), New York: New York Academy of Sciences, 1998, p. 445-450; Buteau, J *et al.*, Diabetologia 42(7):856-864, 1999, cuyas enseñanzas completas se incorporan aquí como referencia).

Se ha propuesto previamente aplicar GLP-1 bioactivo exógeno, o sus análogos, para estimular la regeneración *in vivo* de las células de los islotes, o para obtener células pancreáticas a partir de pacientes con diabetes mellitus y para tratar tales células *ex vivo* en cultivo tisular usando GLP-1 bioactivo. Se consideró que este tratamiento *ex vivo* facilita la regeneración y/o diferenciación de las células de los islotes, que entonces podrían sintetizar y segregar insulina o glucagón (Zhou, J *et al.*, Diabetes, 48(12):2358-2366, 1999; Xu, G. *et al.*, Diabetes, 48(12):2270-2276, 1999, cuyas enseñanzas completas se incorporan aquí como referencia).

Sin embargo, tal régimen de tratamiento requiere la aplicación entérica o parenteral de GLP-1 bioactivo a pacientes, incluyendo la posibilidad de cirugía. Un aspecto es obviar la necesidad de aplicaciones quirúrgicas, entéricas o parenterales de GLP-1 bioactivo.

Sumario

La presente invención se refiere a un nuevo método en el que la reducción de actividad en la enzima Dipeptidil Peptidasa (DP IV o CD 26) o de la actividad enzimática similar a DP IV en la sangre de mamíferos, inducida por efectores de la enzima, conduce como consecuencia causal a una degradación reducida del polipéptido gastrointestinal Péptido Amida-1 7-36 similar a glucagón (GLP-1₇₋₃₆) (o análogos funcionales estructuralmente relacionados de este péptido, tales como GLP-1₇₋₃₆, o fragmentos truncados pero biológicamente activos de GLP-1₇₋₃₆) por DP IV y enzimas similares a DP IV. Tal tratamiento dará como resultado una reducción o retraso en la disminución de la concentración de hormonas peptídicas circulantes de GLP-1 (incluyendo derivadas de GLP-1) activas funcionales o de sus análogos.

Como consecuencia de la estabilidad potenciada resultante de los péptidos circulantes de GLP-1 (incluyendo los derivados de GLP-1) endógenos provocada por la inhibición de la actividad de DP IV, se prolonga la actividad de GLP-1, dando como resultado hormonas peptídicas circulantes de GLP-1 (incluyendo derivadas de GLP-1) funcionalmente activas que facilitan la estimulación, similar a la hormona del crecimiento, de células pancreáticas, de tal forma que estas células proliferan en células funcionalmente activas de los islotes de Langerhans. Adicionalmente, las células pancreáticas insensibles o las células pancreáticas alteradas se pueden transformar en células funcionalmente activas de los islotes de Langerhans cuando se exponen a GLP-1.

Se esperó que la transformación de las células pancreáticas insensibles o de las células pancreáticas alteradas en células funcionalmente activas de los islotes de Langerhans diese como resultado una secreción aumentada de insulina, y un aumento de la insulinemia en el plasma sanguíneo. Sorprendentemente, en estudios en voluntarios humanos sanos y en ratas Zucker diabéticas obesas, la insulinemia disminuyó después del tratamiento con el inhibidor DP IV hemifuroato de isoleucil-diazolidina (P32/98) (véanse los ejemplos 1 y 2, respectivamente). No obstante, la regeneración resultante de los islotes de Langerhans no cambia la eficacia de la insulina endógena ni de otras hormonas de los islotes, tales como glucagón, de tal manera que se vea afectada la estimulación del metabolismo de hidratos de carbono de un mamífero tratado. Como resultado, la glucemia cae por debajo de la concentración de glucosa característica para hiperglucemia, como se muestra en los ejemplos 1 y 2. El mecanismo que acciona estos efectos no es conocido en detalle. Sin embargo, esta regeneración resultante de las células de los islotes afecta adicionalmente a las anomalías del metabolismo, incluyendo glucosuria, hiperlipidemia, así como acidosis metabólica grave y diabetes mellitus, evitando o aliviando estas secuelas.

En contraste con otros métodos propuestos conocidos a la técnica, tales como el trasplante de células o tejidos pancreáticos, o el tratamiento *ex vivo* de células pancreáticas usando GLP-1 o exendina-4 seguido del reimplante de las células tratadas, la presente invención no provoca ni requiere cirugía complicada y costosa, y proporciona una terapia oralmente disponible. La actual invención representa un nuevo enfoque para reducir la concentración elevada de glucemia. Es comercialmente útil y adecuado para uso en un régimen terapéutico, especialmente en lo que se refiere a enfermedades humanas, muchas de las cuales están provocadas por niveles de glucosa prolongados o elevados.

Breve descripción de las figuras

Se puede tener una comprensión adicional de la actual invención mediante referencia a las figuras, en las que:

La Fig. 1 es una representación gráfica de la dependencia con el tiempo de GLP-1 bioactivo circulante en seres humanos (n=36) dependiendo de la formulación inhibidora de DP IV P32/98 aplicada oralmente;

La Fig. 2 es una gráfica que representa la dependencia de la AUC de GLP-1 bioactivo circulante en seres humanos (n=36) sobre la formulación inhibidora de DP IV P32/98 aplicada oralmente;

La Fig. 3 es una representación gráfica que muestra la mejora de la glucemia matutina (MBG) tras la aplicación monoterapéutica subcrónica de 8,7 mg/kg de P32/98 a ratas fa/fa diabéticas obesas;

La Fig. 4a es una representación gráfica que muestra el control mejorado de la glucosa debido al tratamiento con inhibidor de DP IV después de 16 días de tratamiento en ratas diabéticas obesas;

La Fig. 4b es una representación gráfica que muestra la secreción reducida de insulina debida a un tratamiento con inhibidor de DP IV después de 6 días de tratamiento en ratas diabéticas obesas;

La Fig. 5a es una representación gráfica que muestra los niveles de glucemia en función del tiempo en el mantenimiento de glucemia mejorada después de 21 días de tratamiento subcrónico de ratas fa/fa diabéticas obesas mediante el inhibidor de DP IV formulado P32/98;

La Fig. 5b es una representación gráfica que muestra los niveles de insulina plasmática en función del tiempo en el mantenimiento de glucemia mejorada tras 21 días de tratamiento subcrónico de ratas fa/fa diabéticas obesas mediante el inhibidor de DP IV formulado P32/98.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un nuevo método para diferenciar y/o reconstituir células pancreáticas. La regeneración resultante de las células de los islotes de Langerhans afectará positivamente a la síntesis y liberación de insulina endógena y de otras hormonas de los islotes, tales como glucagón, de una manera tal que se verá afectada la estimulación del metabolismo de hidratos de carbono.

La secreción de insulina inducida por glucosa está modulada por un número de hormonas y neurotransmisores. De interés específico son las dos hormonas del intestino, el péptido similar a glucagón de tipo 1 (GLP-1) y el péptido inhibidor gástrico (GIP), las cuales son ambas agentes insulínótropicos. Los agentes insulínótropicos pueden estimular, o provocar la estimulación de, la síntesis o expresión de la hormona insulina.

GLP-1 es un agente insulínótropico intestinal potente que aumenta la secreción de insulina y reduce de forma aguda los niveles de glucosa, incluyendo niveles observados en diabetes de Tipo I y Tipo II. GLP-1 se forma mediante escisiones específicas de tejidos alternativas en las células L del intestino, las células α de la pancreasa endocrina, y neuronas en el cerebro. GIP se sintetiza y libera a partir del duodeno y yeyuno proximal postprandialmente. Su liberación depende de varios factores, incluyendo el contenido de la comida y el estado de salud preexistente. Se descubrió inicialmente y se nombró por sus propiedades inhibidoras del ácido gástrico. Sin embargo, a medida que ha progresado la investigación en torno a esta hormona, se han elucidado papeles fisiológicos más importantes. Específicamente, la GIP es un agente insulínótropico con un efecto estimulante sobre la síntesis y liberación de insulina.

La DPIV es una enzima que es una exopeptidasa que escinde selectivamente péptidos tras los penúltimos restos de prolina y alanina N-terminales. Los sustratos endógenos para esta enzima incluyen las incretinas, tales como polipéptidos insulínótropicos dependientes de glucosa, como GIP y GLP-1. En presencia de DP IV, estas hormonas son reducidas enzimáticamente a formas inactivas. La forma inactiva de GIP y GLP no puede inducir la secreción de insulina, y de este modo los niveles de glucemia son elevados, especialmente en el estado hiperglucémico. Los niveles elevados de glucemia se han asociado con muchas patologías diferentes, incluyendo diabetes mellitus (Tipo 1 y 2) y las secuelas que acompañan a la diabetes mellitus.

También se ha descubierto que DP IV desempeña un papel en las respuestas inmunitarias mediadas por células T, por ejemplo en trasplantes. Se ha demostrado que la inhibición de DP IV prolonga los aloinjertos cardíacos. Adicionalmente, la inhibición de DP IV ha contribuido a la supresión de artritis reumatoide. También se le ha atribuido un papel a la DP IV en la penetración del VIH en las células T (células auxiliares T).

Se han desarrollado agentes, tales como P32/98, N-(N'-glicilsustituido)-2-cianopirrolidinas, L-*treo*-isoleucil tiazolidina, L-*alo*-isoleucil diazolidina, L-*treo*-isoleucil pirrolidina, y L-*alo*-isoleucil pirrolidona, que inhiben la actividad enzimática de DP IV, y se describen en los documentos US 6.001.155, WO 99/61431, WO 99/67278, WO 99/67279, DE 19834591, WO 97/40832, DE 19616486 C2, WO 98/19998, WO 00/07617, WO 99/38501, y WO 99/46272, cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Los documentos DE 29909210 U1 y DE 29909211 U1 describen los inhibidores de DP IV isoleucil diazolidina e isoleucil pirrolidona, y sus sales. El objetivo de estos agentes es inhibir DP IV, y, al hacerlo, reducir los niveles de glucemia, tratando de ese modo eficazmente la hiperglucemia y enfermedades concomitantes asociadas con niveles elevados de glucemia. Pederson *et al.*, Diabetes, 47(8), 1998, p 1253-1258, agosto de 1998, describe que la administración de isoleucil diazolidina inhibió los niveles circulantes de DP IV, y potenció la secreción de glucosa y mejoró la tolerancia a la glucosa en respuesta a una exposición a glucosa oral en ratas delgadas y grasas obesas (*fa/fa*). Sorprendentemente, se ha descubierto que tales agentes se pueden emplear ventajosamente para un fin terapéutico completamente diferente que el conocido previamente por los expertos en la técnica.

La presente invención proporciona un inhibidor de la actividad enzimática de DP IV para evitar diabetes mellitus en un mamífero.

La invención también proporciona el uso de un inhibidor de la actividad enzimática de DP IV, para la fabricación de un medicamento para la prevención de diabetes en un mamífero.

Las enfermedades que demuestran característicamente hiperglucemia incluyen enfermedades tales como diabetes mellitus, Tipo I y II. La diabetes se puede caracterizar generalmente como una producción insuficiente de hormona por las células β pancreáticas. Normalmente, estas células sintetizan y segregan la hormona insulina. En la diabetes de Tipo I, esta insuficiencia es debida a la destrucción de las células beta por un proceso autoinmunitario. La diabetes de Tipo II es debida principalmente a una combinación de deficiencia de células beta y resistencia periférica a la insulina. En el paciente diabético, el número de células beta está reducido, de forma que no sólo hay una preocupación con respecto a la capacidad de las células beta para sintetizar y liberar insulina fisiológica, sino también existe una preocupación con respecto a la masa crítica de estas células pancreáticas que producen insulina. Se sabe que la pérdida de células beta se produce con la presencia de diabetes. Con la pérdida de estas células productoras de insulina, existe un esfuerzo sobre la función endocrina del páncreas para producir, por ejemplo, insulina. Con la pérdida de producción de insulina, se pueden exacerbar los procesos patológicos debidos a hiperglucemia.

GLP-1 actúa como una hormona del crecimiento de los islotes, estimulando la proliferación de células β , el incremento de la masa celular, y promoviendo que las células pancreáticas no diferenciadas se diferencien en células especializadas de los islotes de Langerhans. Tales células pancreáticas expuestas a GLP-1 muestran una secreción mejorada de insulina y glucagón (Yaekura, K. *et al.*, IN: VIP, PACAP, and Related Peptides, W.G. Forssmann y S.I. Said (eds.), New York: New York Academy of Sciences, 1998, p. 445-450; Buteau, J *et al.*, Diabetologia 42(7):856-864, 1999). Se ha descubierto que es deseable incrementar la semivida de GLP-1 para facilitar de ese modo la reconstitución de las células beta pancreáticas. También se ha descubierto un método mediante el cual se puede atenuar el catabolismo de GLP-1, a fin de mejorar la reconstitución de las células pancreáticas.

El método de la presente invención para prevenir diabetes en un mamífero, incluyendo pero sin limitarse a seres humanos, comprende potenciar la presencia de GLP-1 inhibiendo DP IV, o actividades enzimáticas relacionadas, usando un inhibidor de la enzima. En la mayoría de las circunstancias, puede ser preferible la administración oral de un inhibidor de DP IV. Sin embargo, en la presente invención se prevén otras vías de administración. Mediante la inhibición de la actividad enzimática de DP IV, se prolongará apreciablemente y se mantendrá en condiciones fisiológicas la semivida de la forma activa de GLP-1. La presencia prolongada de GLP-1 activo, en particular en el tejido pancreático, facilitará la diferenciación de células epiteliales pancreáticas en células efectoras pancreáticas, como células β productoras de insulina. Además, la prolongación de la presencia fisiológicamente activa de GLP-1 en el tejido pancreático facilitará la regeneración de aquellas células β que ya están presentes pero necesitan ser reparadas. Sorprendentemente, este efecto sólo es observable después de la dosificación repetida (véase el ejemplo 2). Puesto que, después de la retirada de la medicación, se restaura el estado metabólico antes del tratamiento, es necesaria la dosificación subcrónica o crónica del inhibidor de DP IV para mantener la glucemia mejorada lograda. Estas células productoras de insulina reparadas pueden contribuir entonces eficazmente a la corrección y mantenimiento de los niveles glucémicos fisiológicos normales.

En la presente invención, la GLP-1 endógena se sintetiza y libera en las rutas fisiológicas normales. La ingestión de una comida puede estimular la liberación de GLP-1. Como alternativa, se puede suministrar oralmente glucosa o su análogo en forma de un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, una "pastilla de azúcar"), a fin de estimular la liberación de GLP-1 endógena. Tal glucosa se puede tomar antes, concurrentemente o después de la administración de los inhibidores de DP IV.

Esta invención también proporciona composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente (o profilácticamente) eficaz del inhibidor (y/o una pastilla de azúcar para acompañar la administración de un inhibidor de DP IV), y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. El vehículo y la composición se producen en condiciones de buenas prácticas de laboratorio, y son estériles. La formulación se selecciona de forma ideal para adecuarse al modo de administración, según la práctica convencional.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones salinas (por ejemplo, NaCl), alcoholes, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, hidratos de carbono tales como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco, parafina viscosa, aceite de perfume, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc. Las preparaciones farmacéuticas pueden ser esterilizadas, y, se desea, mezcladas con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir sobre la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes, saborizantes y/o aromáticas, y similares, que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos, pero que mejoran la estabilidad, capacidad de fabricación y/o aspecto estético.

Si se desea, las composiciones también pueden contener cantidades más pequeñas de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Además, la composición puede ser una disolución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, pastilla, cápsula, formulación de liberación sostenida, o polvo. Además, la composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

Además, las composiciones se pueden formular según métodos que son bien conocidos en la técnica de composición farmacéutica adaptados para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son disoluciones tamponadas acuosas isotónicas estériles. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para reducir el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran separadamente, o se mezclan juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua, en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o saquito que indica la cantidad de compuesto activo. Cuando la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua estéril de grado farmacéutico, disolución salina o dextrosa/agua. Cuando la administración se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección, o disolución salina, de forma que los ingredientes se pueden mezclar justo antes de la administración.

Finalmente, las composiciones de la invención se pueden formular como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres, tales como las derivadas de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, y otras formas salinas que son bien conocidas en la técnica.

La cantidad de la composición de la invención que será eficaz en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos *in vitro* y/o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad o trastorno. La dosis se debería de decidir según el juicio del médico que tiene en cuenta las circunstancias de cada paciente.

Ejemplos

Ejemplo 1

El inhibidor de DP IV P32/98 es transportado activamente vía el transportador peptídico intestinal PepT1. El transporte rápido y activo de P32/98 a través de la mucosa intestinal es responsable de su rápido comienzo. El $t_{\max}$ es un prerrequisito para la selección eficaz de dipeptidilpeptidasa IV (DPIV) como diana. La administración oral de P32/98 da como resultado una inhibición diana máxima de 15 a 20 minutos y 30 a 40 minutos tras la ingestión en ratas y en seres humanos, respectivamente. Por lo tanto, el inhibidor de DP IV se debería de administrar 10-20 minutos antes de la ingestión de glucosa o de la comida.

En el estudio con los primeros seres humanos con P32/98, se investigaron en 36 voluntarios varones sanos los parámetros farmacodinámicos como la concentración de insulina y la concentración de GLP-1 en el plasma, y la glucemia. La dosificación oral de P32/98 se realizó en las siguientes concentraciones: 7,5 mg, 15 mg, 30 mg, 60 mg, 120 mg y 240 mg. En la Tabla 1 más abajo se resumen los resultados de los parámetros farmacodinámicos anteriores.

Los 36 sujetos varones sanos se dividieron en 3 grupos individuales, conteniendo cada grupo 12 sujetos. En cada grupo individual, 9 sujetos recibieron el fármaco activo P32/98 y 3 recibieron placebo. Los sujetos que recibieron el fármaco activo se dosificaron dos veces, en diferentes periodos y con diferentes concentraciones. Las concentraciones del P32/98 recibidas dentro de los grupos fueron las siguientes: el grupo I recibió 7,5 mg y 60 mg; el grupo II recibió 15 mg y 120 mg; y el grupo III recibió 30 mg y 240 mg. A los sujetos en todos los grupos que recibieron placebo se les suministró placebo en ambos intervalos de la dosificación.

Se realizó un examen de los sujetos previo al estudio 3-14 días antes de su participación en el estudio. Una segunda parte del estudio comprendió una fase experimental y supuso seis tratamientos con dosis individuales de concentraciones ascendentes de P32/98 (periodos I a 6; Tabla II), que concluyó con un examen de seguimiento. Cada sujeto participó en el estudio previo y en la fase experimental, que estaban separados por una fase de reposo farmacológico

ES 2 320 630 T3

de al menos 5 días. El examen de seguimiento se realizó al menos 7 días antes de la última dosis del fármaco del estudio. Los procedimientos de estudio de los seis periodos fueron idénticos, excepto para la dosis bajo investigación.

Métodos

Ensayo de tolerancia a la glucosa oral ("OGTT"): Se necesitó que los sujetos estuviesen en ayunas durante al menos 12 horas y cumpliesen con una dieta rica en hidratos de carbono 3 días antes de cada OGTT. En cada ensayo de tolerancia a la glucosa, los sujetos ingirieron 300 ml de una disolución de mono-/disacárido, equivalente a 75 g de glucosa (Dextro® O.G.-T, Boehringer, Mannheim, FRG). Se tomaron muestras de sangre (1,2 ml en tubos de fluoruro de sodio) inmediatamente antes de la ingesta de glucosa y a 30, 60, 90 y 120 minutos después. Cualquier concentración de glucosa por encima de 126 mg/dl (7,0 mmol/l), a 0 min. y 120 min., se consideró que estaba en un estado patológico de tolerancia a la glucosa.

En el día 1 de cada periodo de dosificación se realizó un OGTT extendido. Los sujetos ingirieron 300 ml de una disolución de mono-/disacárido, equivalente a 75 g de glucosa. Se tomaron muestras de sangre (1,2 ml) en los siguientes intervalos: (1) 5 minutos antes de la ingestión de glucosa; (2) a 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 y 180 minutos después de la ingestión de la glucosa; (3) 4, 12, 24 y 48 horas después de la ingestión de la glucosa. Adicionalmente, se tomaron otras evaluaciones fármaco-dinámicas que son bien conocidas en la técnica.

Insulina: Se recogieron 4,7 ml de sangre en tubos de EDTA de 4,9 ml. Las muestras se centrifugaron (1500 g, 10 min.), y se almacenaron congeladas a -70°C hasta el análisis de laboratorio.

Glucosa: Se recogieron 1,2 ml de sangre en tubos de fluoruro de sodio de 1,2 ml. Las muestras de plasma se centrifugaron a 1500 g durante 10 min., y se almacenaron congeladas a -70°C hasta el análisis de laboratorio.

GLP-1: Se recogieron 2,7 ml de sangre en tubos de EDTA, y se colocaron en hielo o se refrigeraron, a los que se añadió el inhibidor de dipeptidilpeptidasa IV. El inhibidor se preparó con anterioridad por los investigadores. La sangre se recogió en tubos, y se centrifugó inmediatamente a 1000xg durante 10 min. en una centrifugadora refrigerada, o la sangre se colocó en hielo y se centrifugó en 1 hora y se dividió en alícuotas en muestras iguales. La sangre se almacenó en alícuotas apropiadas a -70°C (para evitar múltiples ciclos de congelación/descongelación) hasta el análisis de laboratorio.

Resultados

Concentraciones de GLP-1 activa: Se encontró un efecto de P32/98 dependiente de la dosis, en comparación con el placebo. Las concentraciones individuales globales variaron entre 2-68 pmoles/l. Las medias de los grupos pre-dosis estuvieron entre $3,77 \pm 2,62$ pmoles/l y $6,67 \pm 9,43$ pmoles/l, y aumentaron hasta 4,22 y 7,66 pmoles/l tras el uso de un placebo, pero en 11,6 pmoles/l (15 mg) y 15,99 pmoles/l (240 mg de P32/98) tras el uso del inhibidor. Si el incremento relativo medio se estima a partir de las concentraciones absolutas, las concentraciones de GLP-1 activa aumentó en aproximadamente 200-300% después del tratamiento con placebo, pero en aproximadamente 300-400% después del tratamiento con P32/98. El incremento absoluto en las medianas después de 15-240 mg de P32/98 fue 2-3 veces mayor en comparación con el placebo y la dosis de 7,5 mg (véase la Tabla 1), y apenas indica una relación de respuesta a la dosis. Había un incremento por encima de los valores de pre-dosis hasta aproximadamente 3-4 horas con relación a la dosis de P32/98.

Las concentraciones de insulina mostraron un intervalo individual global de valores entre 3,40 y 155,1 μ IU/ml. Las concentraciones medias ($\pm$ SD) pre-dosis variaron entre $7,96 \pm 1,92$ μ IU/ml (30 mg) y $11,93 \pm 2,91$ μ IU/ml (60 mg de P32/98). Tras la ingestión de 75 g de glucosa a 10 minutos después de las dosis de P32/98/placebo, las concentraciones medias de insulina crecieron en 30,12 μ IU/ml (120 mg de P32/98) hasta 56,92 μ IU/ml (grupo de 30 mg) en 40-55 minutos. No hubo ninguna diferencia aparente entre los grupos de dosificación con placebo y con P32/98, y, nuevamente, no hay signos de un efecto de P32/98 dependiente de la dosis. De forma interesante, el incremento absoluto en la concentración de insulina fue más bajo en los dos grupos de dosificación con P32/98 más elevados (véase la Tabla 1). Las concentraciones de insulina fueron elevadas durante 3-4 horas en todos los grupos del estudio, incluyendo el placebo.

Las concentraciones de glucosa mostraron un intervalo global entre 2,47 y 11,7 mmol/l en el estado en ayunas, durante OGTT, o después de las comidas en todos los sujetos del estudio. Las concentraciones medias pre-dosis, entre $4,55 \pm 0,41$ (15 mg) y $4,83 \pm 0,30$ mmol/l (7,5 mg de P32/98), concuerdan de forma muy próxima entre sí, y mostraron poca variación. Las concentraciones medias máximas se alcanzaron en 40-55 minutos después de la dosificación, es decir, en 30-45 minutos después de la dosis de glucosa de 75 g. Las concentraciones medias absolutas fueron más elevadas en los dos grupos de dosificación con placebo y con 7,5 mg de P32/98. Las medias absolutas más bajas se obtuvieron a partir de los grupos de dosificación de 15 mg, 60 mg y 240 mg. Los cambios medios correspondientes oscilaron entre 3,44 y 4,21 mmol/l, y 1,71 y 3,41 mmol/l, respectivamente, y concuerdan de forma muy próxima con las medianas proporcionadas en la Tabla 1. Aunque no se observó ninguna dependencia perfecta con la dosis, estos resultados indican un menor incremento en las concentraciones de glucosa con dosis crecientes de 15-240 mg de P32/98 en comparación con el placebo.

ES 2 320 630 T3

TABLA 1

Cambios máximos en los parámetros farmacodinámicos (0-12 h, medianas)

	Placebo (1-3)	7,5 mg P32/98	15 mg P32/98	30 mg P32/98	Placebo (4-6)	60 mg P32/98	120 mg P32/98	240 mg P32/98
GLP-1, activa [pmol/l]	3,90 0:25h	4,10 1:10h	10,00 0:25h	10,60 0:40h	5,30 0:40h	12,20 0:25h	11,10 0:25h	14,50 0:25h
Insulina [μIU/ml]	46,29 0:55h	41,86 0:55h	29,67 0:55h	59,84 0:40h	42,90 0:40h	43,35 0:40h	28,63 0:40h	33,36 0:40h
Glucosa [mmol/l]	3,43 0:55h	4,66 0:55h	2,43 0:55h	3,38 0:40h	5,33 0:55h	2,92 0:40h	2,39 0:40h	1,73 0:40h

TABLA 2

C_{max} corregida y AUC de las concentraciones de glucosa 0-3 h después de OGTT

	AUC _{0→180min.} [mmol*min./l]			C _{max} [mmol]		
	Media ± SD	Estimado ¹	95%-CI	Media ± SD	Estimado	95%-CI
Periodos 1-3						
Placebo	223,9 ± 143,3			4,16 ± 1,10		
7,5 mg de P32/98	299,7 ± 111,4	75,8	-48,1 - 199,7	4,94 ± 1,58	0,78	-0,40 - 1,96
15 mg de P32/98	130,9 ± 125,2	-93,0	-216,9 - 30,9	2,92 ± 1,10	-1,24*	-2,43 - -0,06
30 mg de P32/98	116,1 ± 134,0	-170,7	-231,6 - 16,2	3,26 ± 1,07	-0,90	-2,08 - 0,28
Periodos 4-6						
Placebo	252,9 ± 103,3			4,91 ± 1,14		
60 mg de P32/98	151,8 ± 99,2	-101,1	-204,8 - 2,6	3,50 ± 1,66	-1,41*	-2,66 - 0,17
120 mg de P32/98	126,7 ± 147,3	-126-1*	-229,8 - -22,4	3,09 ± 1,47	-1,82**	-3,07 - -0,58
240 mg de P32/98	24,7 ± 66,6	-228,2***	-331,8 - 124-5	1,99 ± 0,69	-2,92***	-4,16 - -1,68
¹ Resultados de una comparación ANOVA frente a placebo * p<0,05; ** p>0,01; *** p>0,001						

Las concentraciones pico (C_{max}) medias de glucosa, corregidas con referencia al valor inicial, superaron 4,0 mmoles/l sólo en los dos grupos de dosificación con placebo y con 7,5 mg de P32/98. Estos valores también estuvieron por debajo de 3,0 mmoles/l en los grupos de tratamiento con 15 mg y 240 mg de P32/98. La diferencia comparada con el tratamiento con placebo fue estadísticamente significativa para los grupos de dosificación con 15 mg, 60 mg, 120 mg y 240 mg de P32/98, pero no para los grupos de dosificación de 7,5 mg y 30 mg. Los valores medios de AUC corregidos con respecto al valor inicial fueron >200 mmoles*min./l después del placebo y de 7,5 mg de P32/98, pero claramente estaban por debajo de 200 mmoles*min./l después de las dosis de 15 mg y 240 mg de P32/98. La reducción en la exposición sistémica a glucosa del OGTT fue estadísticamente significativa para los grupos de dosificación de 15 mg, 60 mg, 120 mg y 240 mg de P32/98, pero no para los grupos con dosis de 7,5 mg y 30 mg (véase la Tabla 2). La evaluación de los valores corregidos con respecto al valor inicial fue muy similar a la obtenida a partir de los datos no corregidos. De este modo, los datos indicaron una exposición a glucosa claramente inferior después del OGTT en sujetos sanos tratados con P32/98, que fue una indicación aproximada pero no perfecta de la dependencia con la dosis.

Conclusiones

Los resultados de este estudio permiten las siguientes conclusiones farmacodinámicas:

- 5 La GLP-1 activa aumentó en aproximadamente 300-400% tras el tratamiento con P32/98 10 minutos antes de OGTT, pero no se observó ningún efecto discernible a partir del tratamiento con placebo para el nivel de dosificación de 7,5 mg (véanse las figuras 1 y 2). Las concentraciones de insulina parecen ser menores a dosis de 120-240 mg tras la estimulación con 75 g de glucosa. Durante el OGTT en sujetos sanos, las concentraciones de glucosa mostraron un incremento significativamente menor después del tratamiento con P32/98 (15-240 mg) en comparación con el placebo, 10 que estaba relacionado con la dosis de P32/98.

Ejemplo 2

- 15 En la rata Zucker obesa, la dependencia del nutriente de P32/98 apoya la secreción inicial de insulina. Sin embargo, durante un tratamiento subcrónico, P32/98 reduce la secreción diaria total de insulina. En comparación con un control, glibenclamida, que aumenta la producción de insulina en 27%, P32/98 provoca un ahorro de insulina, ahorrando un 45% en comparación con el control.

- 20 Se llevaron a cabo pruebas para determinar si P32/98 es un candidato primario para influir sobre la tolerancia a la glucosa *in vivo* incrementando las semividas circulantes de las incretinas GIP y GLP-1. Se llevaron a cabo estudios comparativos con glibenclamida (Maninil®, Berlin-Chemie, Berlín, Alemania) como sustancia de referencia. La glibenclamida es uno de los fármacos más eficaces para reducir la glucemia en pacientes diabéticos de Tipo 2, y una de las sulfonilureas prescritas más frecuentemente.

- 25 Se investigaron ratas fa/fa Zucker macho, que muestran anormalidades en el metabolismo de la glucosa y son un modelo animal muy aceptado de diabetes de Tipo 2, de la siguiente manera:

- 30 Se administraron una vez al día P32/98 y glibenclamida antes de la ingesta de alimentos, durante un periodo de 21 días. Los parámetros monitorizados fueron la glucemia matutina y los niveles de insulina plasmática. En un perfil de día-noche, se monitorizaron la glucemia y la insulinemia desde el día 16 hasta el día 17. Se realizó un OGTT finalmente en el día 21 para monitorizar la cinética de la glucemia y de la insulina en plasma, para evaluar los cambios en la tolerancia a la glucosa. La glibenclamida (DAB 1996; R011150/33372) fue donada por Berlin-chemie, (Berlín, Alemania). Las ratas (fa/fa) Zucker macho, de peso corporal de 300 g, se adquirieron de Charles River (Sulzfeld, Alemania).

Métodos

- 40 *Condiciones de enjaulado:* Los animales se mantuvieron enjaulados individualmente en condiciones convencionales, con temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas (luz a las 06:00 a.m.). Se les permitió *ad libitum* peletes estándar (ssniff®, Soest, Alemania) y agua del grifo acidificada con HCl.

- 45 *Cateterización de la arteria carótida:* Después de una semana de adaptación, se implantaron catéteres en la carótida en las ratas con anestesia general (inyección de 0,25 ml/kg i.p. Rompun® [2%], Bayer, Alemania) y 0,5 ml/kg i.p. Velonarkon® (Arzneimittelwerk, Dresden, Alemania). Se dejó que los animales se recuperaran durante una semana. El catéter se enjuagó tres veces por semana con disolución salina de heparina (100 IU/ml).

- 50 *Dosificación repetida:* 30 ratas macho Wistar no diabéticas y 30 ratas macho Zucker diabéticas se distribuyeron al azar en grupos de RP (Producto de Referencia: glibenclamida), TP (Producto de Ensayo: P32/98) y CO (Control) (N=10 por grupo). Después, las ratas Wistar no diabéticas se trataron oralmente una vez al día con RP (5 mg/Kg de peso corporal) o TP (21,61 mg/Kg de peso corporal), y las ratas Zucker diabéticas se trataron oralmente una vez al día con RP (1 mg/Kg de peso corporal) o TP (21,61 mg/Kg de peso corporal) durante 21 días a 05:00 p.m. (antes de la ingestión normal de alimento en la fase de oscuridad). A los controles se les dio oralmente disolución de celulosa al 1% (5 ml/Kg). Cada mañana se tomaron muestras de sangre a 07:30 a.m. de las venas de las colas para la medida de la glucemia y de la insulina en plasma. Las últimas muestras de sangre de esta parte del programa se tomaron a 55 07:30 a.m. en el decimoquinto día, para medir la glucemia y la insulina en plasma. La terapia oral con el fármaco se continuó durante una semana. El registro del perfil diurno-nocturno bajo la terapia anterior de la glucemia ($\Delta t = 3$ h) y de la insulina en plasma ($\Delta t = 3-6$ h) se monitorizó desde el día 16 (comenzando a las 05:00 p.m.) hasta el día 17 (finalizando a las 02:00 p.m.).

- 60 *OGTT:* Se realizó un OGTT final en el día 21 con una toma de muestras de sangre de la vena de la cola. Las muestras de sangre de la vena de la cola se tomaron a -12 h (la noche antes del día 21), a 0 min. (inmediatamente antes de comenzar el OGTT), a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 y 120 min. Las muestras de sangre se tomaron en capilares de vidrio de 20 μl para las medidas de la glucemia, y en tubos Eppendorf (100 μl). Estos últimos se centrifugaron inmediatamente, y las fracciones de plasma se almacenaron a -20°C para el análisis de insulina.

- 65 *Glucemia:* los niveles de glucosa se midieron usando el procemiento de la glucosa oxidasa (Super G Glukosemeßgerät; Dr. Müller Gerätebau, Freital, Alemania).

Insulina plasmática: las concentraciones de insulina se evaluaron mediante el método de RIA con anticuerpos (LINCO Research, Inc. St. Charles, Mo., USA).

Resultados

Perfil diurno-nocturno de glucemia (véase la figura 4 A): La concentración media de glucemia en el grupo de CO en el día 16 fue $7,78 \pm 0,83$ mmol/l antes de la aplicación del fármaco a las 05:00 p.m. Tras la ingestión oral de placebo e ingestión de alimentos en la fase de oscuridad, la glucemia aumentó hasta valores máximos de $12,18 \pm 1,34$ mmol/l a 11:00 p.m. Después, la glucemia disminuyó muy lentamente hasta los valores más bajos de $7,27 \pm 0,61$ mmol/l a 11:00 a.m., seguido de un incremento hasta $8,90 \pm 0,92$ mmol/l a 02:00 p.m. del siguiente día. En el grupo de RP, se observó una gráfica de glucemia similar. Sin embargo, a partir de un valor medio comparable de $7,96 \pm 1,13$ mmol/l a 05:00 p.m. con respecto a los animales del control, hubo un incremento mayor hasta $14,80 \pm 1,46$ mmol/l (11:00 p.m.), y después una disminución hasta $7,66 \pm 1,22$ mmol/l (11:00 a.m.) y una ligera reducción adicional hasta $7,34 \pm 0,77$ mmol/l a 02:00 p.m. del día siguiente, respectivamente. En el grupo de TP, las ratas Zucker tuvieron un valor medio normal de la glucemia de $5,25 \pm 0,16$ mmol/l a 05:00 p.m., y los valores individuales estuvieron en el intervalo de 4,34 a 6,07 mmol/l. La glucemia mostró un incremento de alrededor de 3 mmol/l hasta $8,34 \pm 0,47$ mmol/l a 11:00 p.m. A esto le siguió una disminución permanente hasta valores basales, que se alcanzaron a 08:00 a.m. ($5,64 \pm 0,23$) y que se mantuvieron a 11:00 a.m. ($5,33 \pm 0,14$ mmol/l) y 02:00 p.m. del siguiente día ($5,51 \pm 0,19$ mmol/l), respectivamente.

Perfil diurno-nocturno de insulinemia (véase la figura 4B): Las ratas Zucker de CO y RP fueron fuertemente hiperinsulinémicas. La insulina mostró una variabilidad en los valores medios a 05:00 p.m. en el grupo de CO ($47,0 \pm 8,7$ mg/ml), 08:00 p.m. ($45,5 \pm 7,7$ mg/ml), 05:00 a.m. ($54,2 \pm 5,7$ mg/ml) y 02:00 p.m. del día siguiente ($61,0 \pm 10,2$ ng/ml; NS), que no mostraron relación con las oscilaciones de la glucemia. En el grupo de RP, en la fase de oscuridad desde 06:00 p.m. hasta 06:00 a.m., hubo un incremento significativo de los valores de insulina plasmática, como máximo a 05:00 a.m. Este parámetro aumentó desde valores fuertemente hiperinsulinémicos de $50,0 \pm 8,2$ ng/ml (05:00 p.m.) vía $57,3 \pm 8,2$ ng/ml (08:00 p.m.) hasta $76,3 \pm 8,6$ ng/ml (05:00 a.m.; $p < 0,01$ frente al valor inicial), que fue seguido por una disminución hasta $58,3 \pm 7,3$ mg/ml (02:00 p.m. del siguiente día). En este grupo de RP, la insulina se desplazó enormemente entre fases con relación a las oscilaciones de la glucemia. En el grupo de TP, las ratas Zucker también fueron hiperinsulinémicas. La insulina plasmática a 05:00 p.m. fue significativamente menor que en el grupo de RP ($p < 0,05$ frente a RP). Paralelamente a los incrementos de la glucemia (Fig. IV/3 A), hubo un incremento en la insulina plasmática a 08:00 p.m. ($41,9 \pm 8,5$ ng/ml). El valor máximo de insulina se midió a 05:00 a.m. ($57,1 \pm 8,6$ ng/ml; $p < 0,01$ frente a valores iniciales). La concentración de insulina plasmática se redujo alcanzando la concentración basal ($24,3 \pm 3,7$ ng/ml) a aproximadamente 02:00 p.m. del siguiente día, que fue significativamente menor que los grupos de CO y RP ($p < 0,01$ frente a CO o TP).

OGTT después de un tratamiento de 21 días, curvas de glucemia (véase la figura 5A): La última aplicación de fármaco a 05:00 p.m. y el ayuno durante toda la noche en el día 21 fueron seguidos por una disminución significativa de la glucemia en el grupo de CO, desde $8,68 \pm 1,26$ mmol/l (05:00 p.m.) hasta $5,08 \pm 0,24$ mmol/l ($p < 0,05$), en el grupo de RP de $8,81 \pm 1,21$ mmol/l hasta $4,91 \pm 0,37$ mmol/l ($p < 0,01$), y en el grupo de TP desde $5,75 \pm 0,23$ mmol/l hasta $4,88 \pm 0,13$ mmol/l ($p < 0,01$). Por esta razón, las cargas de glucosa oral se realizaron desde un nivel de concentración de glucosa basal comparable en los tres grupos experimentales encontrado en la mañana (07:30 a.m.).

En el grupo de CO, la glucemia aumentó tras la aplicación de glucosa oral hasta valores pico de $14,64 \pm 1,42$ mmol/l en 40 min. Después, hubo una disminución ligera significativa hasta $9,75 \pm 0,46$ mmol/l al final del ensayo (120 min.). En el grupo de RP, hubo un aumento abrupto hasta mayores valores de glucemia de $16,33 \pm 0,98$ y $16,24 \pm 1,09$ mmol/l a 50 min. y 80 min., respectivamente. Las concentraciones elevadas de glucosa se mantuvieron hasta el final del estudio a 120 min. (100 min.: $15,13 \pm 0,76$ mmol/l, 120 min.: $14,81 \pm 0,66$ mmol/l; NS a partir de los valores pico pasados). En el grupo de TP se encontraron propiedades similares de la curva de glucemia media como en el grupo de CO. La glucemia aumentó hasta $14,54 \pm 0,65$ mmol/l a 50 min., y disminuyó significativamente hasta un valor de $10,67 \pm 0,62$ mmol/l (120 min.; NS a partir de CO).

El área bajo la curva de la glucosa ($G-AUC_{0-120min}$) en los grupos de CO y TP fueron 823 ± 41 y 895 ± 50 mmol-min/l, respectivamente (NS). En el grupo de RP, este parámetro se determinó como 1096 ± 76 mmol-min/l, y ese valor fue significativamente mayor que en los grupos de CO ($p < 0,01$) o TP ($p < 0,05$).

OGTT después de un tratamiento de 21 días, insulina plasmática (véase la figura 5B): el ayuno durante toda la noche en las ratas Zucker condujo a concentraciones reducidas de insulina plasmática en los animales del CO ($14,6 \pm 3,7$ ng/ml), en el grupo de RP hasta $11,8 \pm 1,5$ ng/ml, y en el grupo TP hasta $9,3 \pm 1,5$ mg/ml, respectivamente. Las diferencias entre los grupos experimentales no fueron significativas. Después de un estímulo con glucosa, la insulina plasmática permaneció casi sin cambiar en los grupos de CO, RP y TP. Se encontraron valores ligeramente mayores a 120 min. en el grupo de CO solamente, ascendiendo hasta $21,3 \pm 3,0$ ng/ml, que fue significativamente mayor que en el grupo de TP ($p < 0,05$).

La $I-AUC_{0-120min}$ fue generalmente baja. En el grupo de TP, este parámetro fue menor que en los grupos de CO o RP (NS).

Sumario

Glucemia matutina: Los controles tratados con placebo fueron hiperglucémicos (alrededor de 7,5 mmol/l). La concentración media no cambió durante el estudio. La terapia con RP aumentó la glucemia en alrededor de 1,5 mmol/l en dos días. La glucemia permaneció en el intervalo más elevado. La medicación con TP redujo la glucemia hasta un valor normal en 5 días. La glucemia permaneció en el intervalo normal hasta el final del estudio.

Insulina plasmática: Las ratas Zucker del control fueron hiperinsulinémicas, y mostraron algún incremento adicional de insulina durante los 14 días de observación. Las ratas Zucker tratadas con RP mostraron un incremento de insulina hasta concentraciones significativamente mayores que en los animales del control. La aplicación de TP disminuyó ligeramente la concentración de insulina durante 14 días, en comparación con los animales del control.

OGTT después de un tratamiento durante 21 días, glucemia: El ayuno durante toda la noche redujo la glucemia hasta valores normales en los grupos experimentales. Los animales tratados con el placebo mostraron un incremento de glucemia de alrededor de 9 mmol/l en 40 minutos tras la carga de glucosa, y una ligera disminución después. Las ratas Zucker tratadas con RP mostraron un incremento de la glucemia de alrededor de 11 mmol/l tras la carga de glucosa, sin disminución durante el ensayo. La curva media de glucemia de los animales tratados con TP no fue diferente de la de los controles. El tratamiento con RP aumentó la G-AUC; la medicación con TP no aumentó la G-AUC en comparación con la aplicación de placebo.

OGTT después de un tratamiento de 21 días, insulina plasmática: Las ratas Zucker del control tuvieron la insulina en ayunas más elevada de los tres grupos experimentales, de alrededor de 15 ng/ml. Tras la carga de glucosa, la insulina aumentó significativamente sólo al final del ensayo (120 min.). Las ratas tratadas con RP tuvieron alguna insulina en ayunas de ~12,5 ng/ml al comienzo del OGTT, y un incremento temprano a 40 min., sin disminución al final del ensayo. Las ratas tratadas con TP tuvieron la insulina en ayunas más baja, de ~9 ng/ml, al comienzo del OGTT, un incremento temprano modesto a 20 min. en relación con la elevación de la glucemia, y concentraciones reducidas entre 40 min. y 100 min. La I-AUC fue ligeramente menor en las ratas tratadas con TP.

Conclusión

El inhibidor de DPIV P32/98 (TP), dado una vez al día, normalizó la glucemia matutina, redujo la hiperinsulinemia, mantuvo la glucemia en el perfil diurno-nocturno por debajo del valor crítico (para pacientes diabéticos) de 8,3 mmol/l. El beneficio metabólico se retuvo durante un tiempo limitado tras el cese de la medicación de P32/98.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de la actividad enzimática de DPIV, para prevenir la diabetes mellitus en un mamífero.

2. Un inhibidor de la actividad enzimática de DPIV según la reivindicación 1, para prevenir la diabetes mellitus Tipo II en un mamífero.

3. Un inhibidor de la actividad enzimática de DPIV según la reivindicación 1 ó 2, mediante el cual el inhibidor de DPIV provoca que las células presentes en el páncreas se diferencien en células productoras de insulina.

4. Un inhibidor de la actividad enzimática de DPIV según la reivindicación 1 ó 2, mediante el cual el inhibidor de DPIV provoca que las células pancreáticas proliferen en células funcionalmente activas de los islotes de Langerhans, y/o provoca la transformación de células pancreáticas insensibles o alteradas en células funcionalmente activas de los islotes de Langerhans.

5. El inhibidor de la actividad enzimática de DPIV según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho inhibidor de DPIV se selecciona del grupo que consiste en N-(N'-glicil sustituido)-2-cianopirrolidinas, N-aminoacil-tiazolidinas y N-aminoacil-pirrolidinas.

6. El inhibidor de la actividad enzimática de DPIV según la reivindicación 5, en el que dicho inhibidor de DPIV es L-treo-isoleucil-tiazolidina, L-alo-isoleucil-tiazolidina, L-treo-isoleucil-pirrolidina, L-alo-isoleucil-pirrolidina, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

7. El inhibidor de la actividad enzimática de DPIV según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para administración oral.

8. El inhibidor de la actividad enzimática de DPIV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para inyección iv o im.

9. El inhibidor de la actividad enzimática de DPIV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la administración oral crónica.

10. El inhibidor de la actividad enzimática de DPIV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la administración iv o im crónica.

11. El uso del inhibidor de la actividad enzimática de DPIV, para la fabricación de medicamento para prevenir la diabetes mellitus como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

Fig. 1

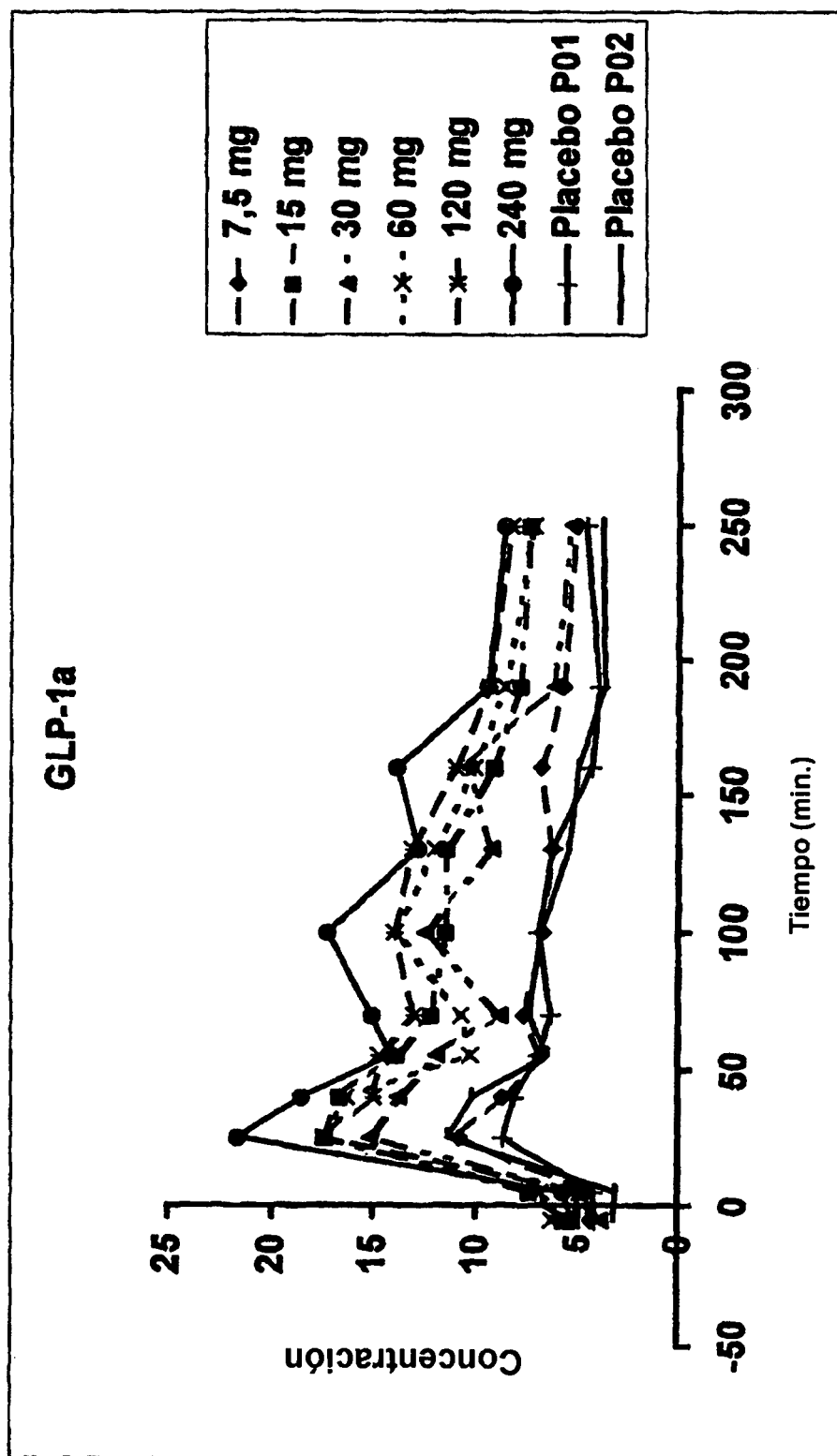


Fig. 2

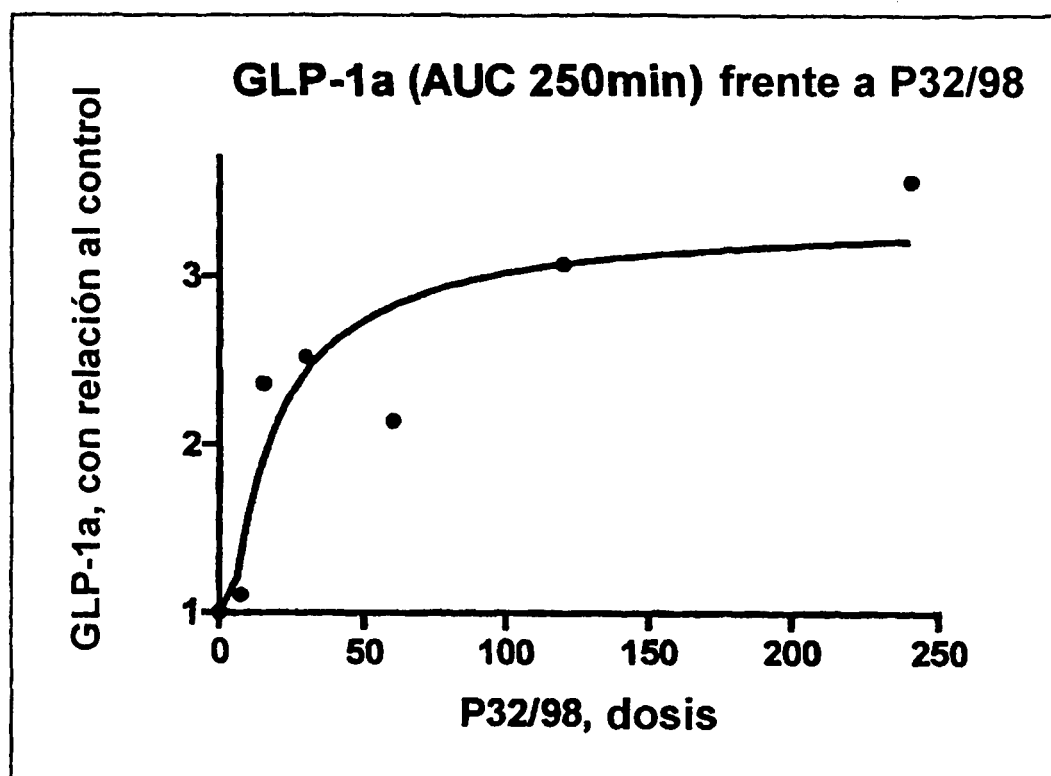


Fig. 3

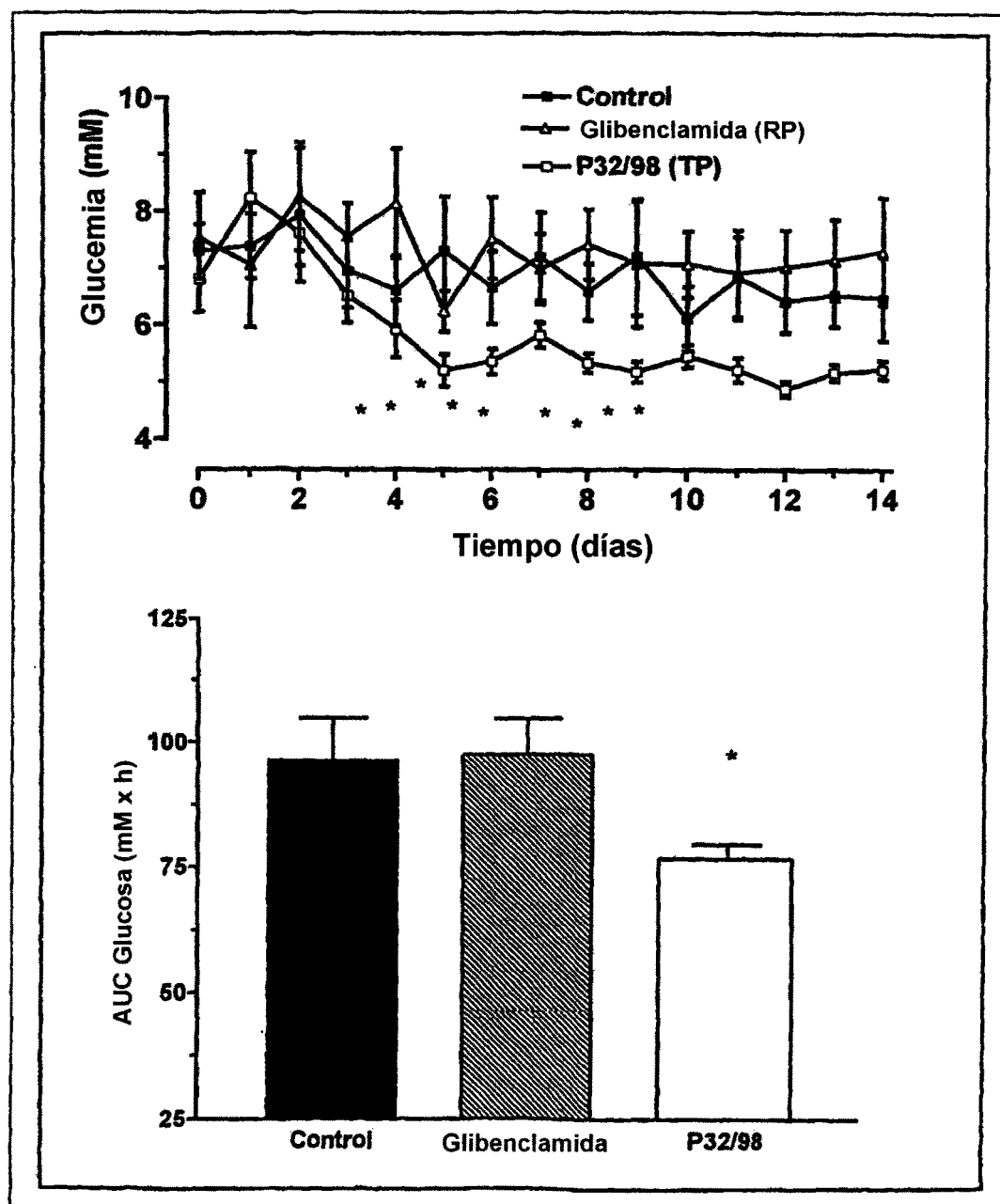


Fig. 4A

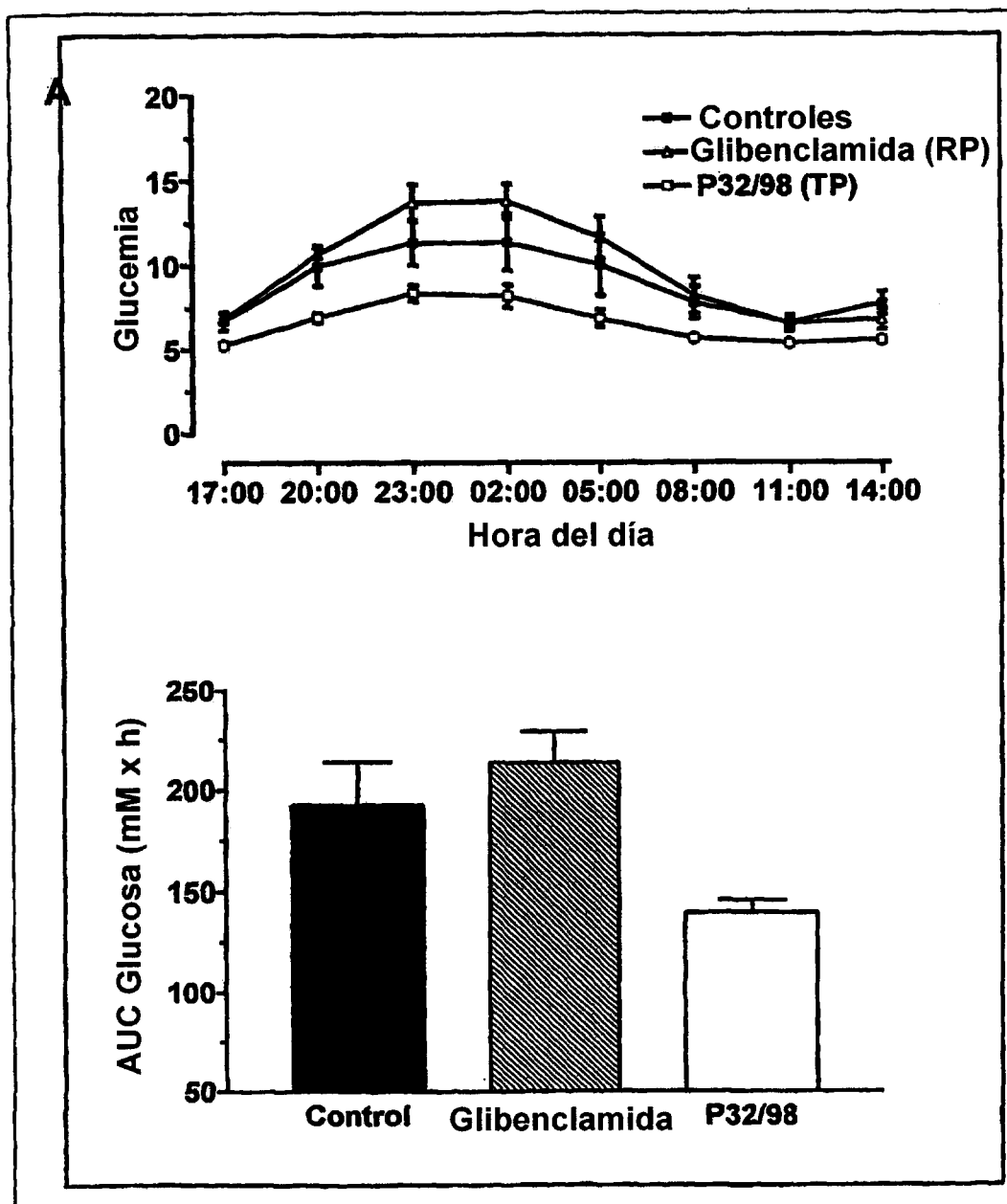


Fig. 4 B

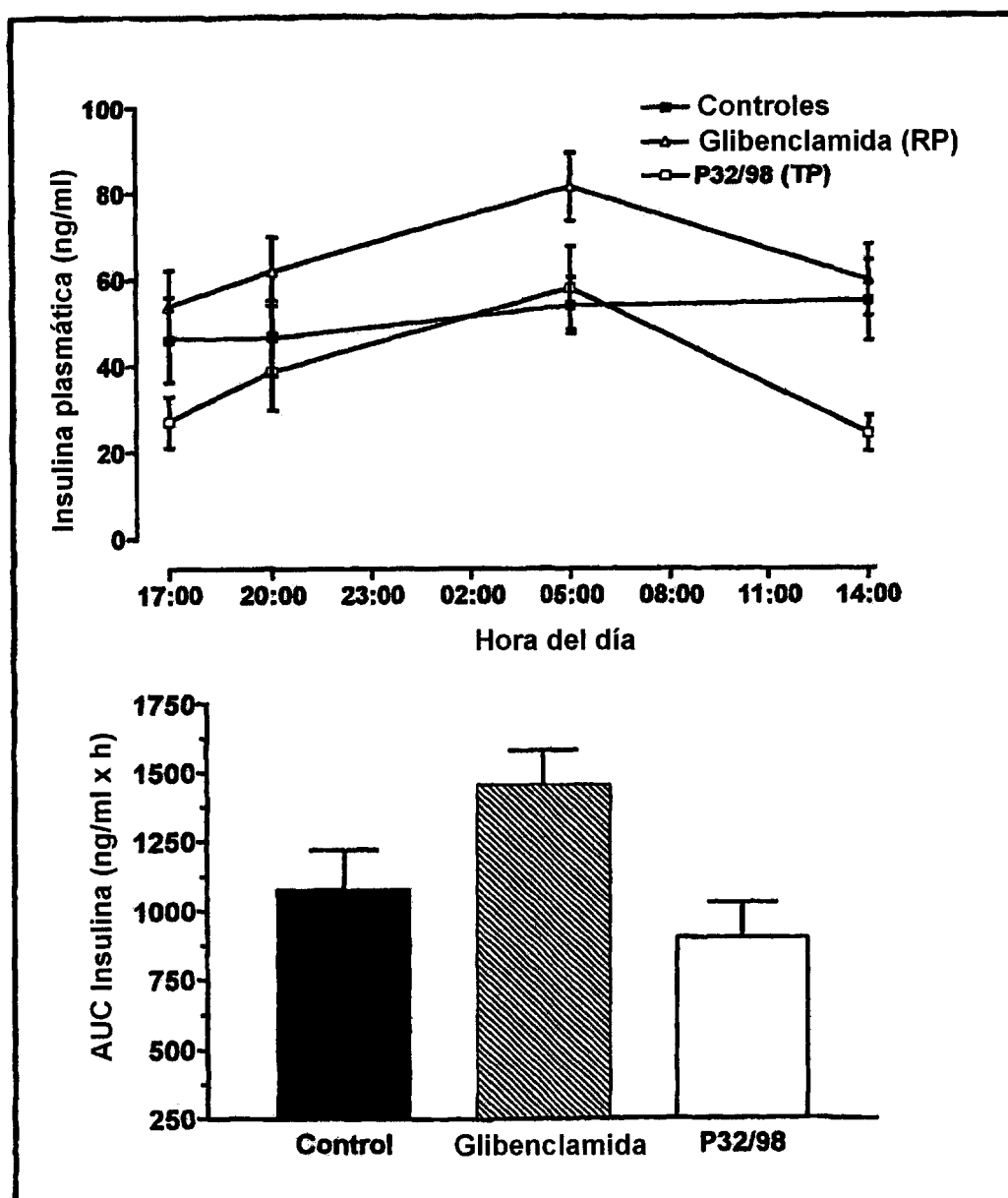
B

Fig. 5 A

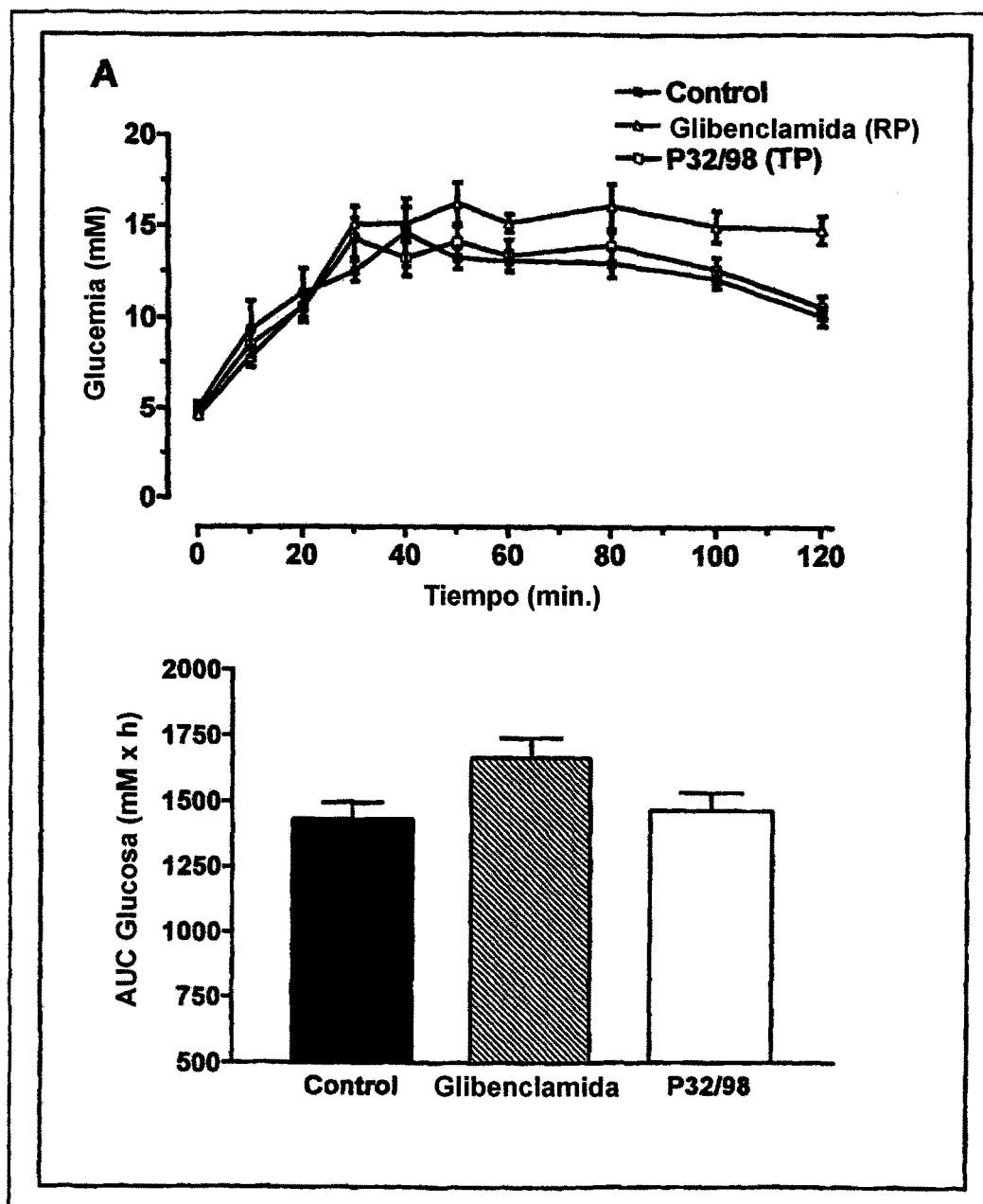


Fig. 5 B

