

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 665**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/401 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

A61K 31/426 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.1997 E 00119496 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 1084705**

54 Título: **Procedimiento para bajar el nivel de glucosa en sangre en los mamíferos**

30 Prioridad:

25.04.1996 DE 19616486

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.10.2014

73 Titular/es:

**ROYALTY PHARMA COLLECTION TRUST
(100.0%)**

**Rodney Square North, 1100 North Market Street
Wilmington DE 19890, US**

72 Inventor/es:

**DEMUTH, HANS-ULRICH;
ROSCHE, FRED;
SCHMIDT, JÖRN;
PAULY, ROBERT P., DR.;
MCINTOSH, CHRISTOPHER H.S. y
PEDERSON, RAY A.**

74 Agente/Representante:

MIR PLAJA, Mireia

ES 2 505 665 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

Procedimiento para bajar el nivel de glucosa en sangre en los mamíferos

- 5 **[0001]** La invención se refiere a un sencillo procedimiento para bajar la concentración de azúcar en sangre con ayuda de *efectores* reductores de la actividad (sustratos, pseudosustratos, inhibidores, proteínas de unión y anticuerpos, entre otros) según la reivindicación 1.
- 10 **[0002]** Además de proteasas, que están incluidas en la proteólisis inespecífica, lo cual produce finalmente la descomposición de proteínas en aminoácidos, se conocen proteasas reguladoras que intervienen en la funcionalización (activación, desactivación, modulación) de principios activos peptídicos endógenos [KIRSCHKE, H., LANGNER, J., RIEMANN, S., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S. und BOHLEY, P., Lysosomal cysteine proteases. Excerpta Medica (Ciba Foundation Symposium 75), 15 (1980); KRÄUSSLICH, H.-G. and WIMMER, E., Viral Proteinases. Ann. Rev. Biochem. 57, 701 (1987)]. En particular en relación con la investigación inmune y la investigación de neuropéptidos se ha descubierto una serie de tales así llamadas convertasas, peptidasas señal o encefalinasas [GOMEZ, S., GLUSCHANKOF, P., LEPAGE, A., MARRAKCHI, N. and COHEN, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5468 (1988); ANSORGE, S. and SCHÖNE, E., Histochem. 82, 41 (1987)].
- 15 **[0003]** Debido a la frecuencia de la presencia del aminoácido prolina en una pluralidad de hormonas peptídicas y a las con ello vinculadas propiedades estructurales de estos péptidos se discute para peptidasas específicas de prolina una función análoga a la de las peptidasas señal [YARON, A., The Role of Proline in the Proteolytic Regulation of Biologically Active Peptides, Biopolymers 26, 215 (1987); WALTER, R., SIMMONS, W.H. and YOSHIMOTO, T., Proline Specific Endo- and Exopeptidases. Mol. Cell. Biochem. 30, 111 (1980); VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPE, S., Proline motifs and their biological processing. FASEB Journal 9, 736 (1995)]. Debido a su estructura particular, la prolina determina además en estos péptidos tanto la conformación como la estabilidad de estos péptidos, protegiéndolos contra la descomposición producida por proteasas inespecíficas [KESSLER, H., Konformation und biologische Wirkung von zyklischen Peptiden. Angew. Chem. 94, 509 (1982)]. Las enzimas que por el contrario actúan de manera altamente específica y modificando la estructura en secuencias con contenido de prolina (HIV proteasa y ciclofilina, entre otras) son atractivas dianas de la actual investigación de principios activos. En particular para las peptidasas fragmentadoras post-prolina proil endopeptidasa (PEP) y dipeptidil peptidasa IV (DP IV) pudieron probabilizarse relaciones entre la modulación de la actividad biológica de sustratos peptídicos naturales y su fragmentación selectiva por medio de estas enzimas. Así, se supone que la PEP desempeña un papel en el aprendizaje y en el proceso de la memoria, y que la DP IV está implicada en la transmisión de señales durante la respuesta inmune [ISHIURA, S., TSUKAHARA, T., TABIRA, T., SHIMIZU, T., ARAHATA K. and SUGITA, H., FEBS-Letters 260, 131 (1990); HEGEN M., NIEDOBI-TEK, G. KLEIN, C.E., STEIN, H. and FLEISCHER, B., J. of Immunology 144, 2908 (1990)].
- 20 **[0004]** Análogamente a la extraordinaria especificidad para prolina de estas enzimas se discute su alta selectividad para el aminoácido alanina dentro de típicas regiones de reconocimiento en sustratos de estas enzimas, según la cual los péptidos con contenido de alanina pueden adoptar conformaciones análogas a las de los péptidos estructuralmente análogos con contenido de prolina. Recientemente se han demostrado mediante mutación puntual (intercambio de prolina por alanina) tales propiedades de las cadenas peptídicas con contenido de alanina [DODGE, R.W. and SCHERAGA, H.A., Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. Biochemistry 35 (5) 1548 (1996)].
- 25 **[0005]** Se da actividad de DP IV y/o actividad análoga a la de DP IV (p. ej. La DP II citosólica posee una especificidad de sustrato casi idéntica a la de la DP IV) en el circuito sanguíneo, donde disocia con alta especificidad dipéptidos del terminal N de péptidos biológicamente activos, cuando la prolina o la alanina representan los residuos contiguos del aminoácido N-terminal en su secuencia. Por consiguiente se parte de que esta enzima interviene en la regulación de polipéptidos *in vivo* [VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SHCARPE, S., Proline motifs and their biological processing, FASEB Journal 9, 736 (1995)].
- 30 **[0006]** Los polipéptidos insulinoatrópicos dependientes de glucosa que son el polipéptido inhibidor gástrico 1-42 (GIP₁₋₄₂) y el péptido amida-1 7-36 análogo al glucagón (GLP-1₇₋₃₆), que son hormonas que estimulan la secreción de insulina del páncreas inducida por glucosa (también llamadas *incretinas*), son sustratos de la DP IV, puesto que la misma puede disociar *in vitro* e *in situ* de las secuencias N-terminales de estos péptidos los dipéptidos tirosinil-alanina e histidil-alanina [MENTLEIN, R., GALLWITZ, B., and SCHMIDT, W.E., Dipeptidyl Peptidase IV hydrolyzes gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidina methionine and is responsible for their degradation in human serum. Eur. J. Biochem. 214, 829 (1993)].
- 35 **[0007]** La reducción de tal actividad enzimática de DP IV y/o análoga a la de DP IV para la fragmentación de tales sustratos *in vivo* puede servir para suprimir con eficacia la actividad enzimática indeseada en condiciones de laboratorio así como en estados patológicos de organismos mamíferos [DEMUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. J. Enzyme Inhibition 3, 249-278 (1990); DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On

the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. P. ej. La *Diabetes mellitus* tipo II (también llamada diabetes del adulto) está basada en una reducida secreción de insulina o en perturbaciones de la función receptora, que se fundamentan, entre otras cosas, en anomalías de concentración de origen proteolítico de las incretinas. [BROWN, J.C., DAHL, M., KWAWK, S., MCINTOSH, C.H.S., OTTE, S.C. and PEDERSON, R.A. Peptides 2, 241 (1981); SCHMIDT, W.E., SIEGEL, E.G., GALLWITZ, B. KUMMEL, H., EBERT, R. and CREUTZFELDT, W., Characterization of the insulinotropic activity of fragments derived from gastric inhibitory polypeptide. Diabetologia 29, 591A (1986); ADELHORST, K., HE-DEGAARD, B.B., KNUDSEN, L.B. and KIRK, O., Structure-activity studies of glucagon-like peptide. J. Biol. Chem. 296, 6275 (1994)].

[0008] La hiperglucemia y las causas y/o consecuencias ligadas a la misma (también llamadas *Diabetes mellitus*) se tratan según el actual estado de la técnica mediante la administración de insulina (p. ej. de material aislado de páncreas bovino o bien también obtenido mediante técnica genética) a los organismos enfermos en distintas formas posológicas. Todos los procedimientos conocidos hasta la fecha, así como también los más modernos, se distinguen por un alto gasto de material y unos altos costes, y a menudo por decisivos menoscabos de la calidad de vida de los pacientes. El método clásico (inyección i.v. de insulina diaria, habitual desde los años treinta) trata los síntomas agudos de la enfermedad, pero tras una prolongada aplicación conduce, entre otras cosas, a severas modificaciones vasculares (arterioesclerosis) y lesiones nerviosas [LACY, P., Status of Islet Cell Transplantation. Diabetes Care 16 (3) 76 (1993)].

[0009] Últimamente se propone la instalación de implantes de depósito subcutáneos (la liberación de insulina es dosificada, y se prescinde de las inyecciones diarias), así como la implantación (el trasplante) de células de Langerhans intactas en la glándula pancreática u otros órganos y tejidos funcionalmente perturbados. Tales trasplantes son técnicamente costosos. Además representan una intervención quirúrgica arriesgada en el organismo receptor y exigen también en los trasplantes celulares métodos para la supresión del sistema inmune o para eludirlo [LACY, P., Treating Diabetes with Transplanted Cells. Sci. Americ. 273 (1)40-46 (1995)].

[0010] La aplicación en lo posible oral de inhibidores enzimáticos de bajo peso molecular por el contrario es una alternativa más rentable p. ej. a las técnicas quirúrgicas invasivas en el tratamiento de fenómenos patológicos. Inhibidores enzimáticos de este tipo encuentran entre tanto aplicación terapéutica como inmunosupresores, antitrombóticos y virostáticos para el SIDA. Mediante diseño químico de propiedades de estabilidad, transporte y eliminación su forma de actuación puede ser modificada y adaptada a propiedades individuales [SANDLER, M. and SMITH, H.J., Hrsg., Design of Enzyme Inhibitors as Drugs. Oxford University Press, Oxford (1989); MUNRÖ, J.E., SHEPHERD, T.A., JUNGHEIM, L.N., HORNBACK, W.J., HATCH, S.D., MÜSING, M.A., WISKERCHEN, M.A., SU, K.S., CAMPANALE, K.M., BAXTER, A.J., and COLACINO, J.M., Potent, orally bioavailable HIV-1 protease inhibitors containing noncoded D-amino acids. Bioorg. Medicinal Chem. Letters 5 (23) 2897 (1995)].

[0011] La finalidad de la invención es un procedimiento sencillo y novedoso para bajar el nivel de glucosa en sangre, que según la invención puede lograrse gracias al hecho de que mediante la administración de efectores reductores de la actividad a un organismo mamífero, como consecuencia causal los péptidos insulínotropicos endógenos (o administrados además exógenamente) GIP₁₋₄₂ y GLP-1₇₋₃₆ son menos descompuestos por la DP IV y con ello se reduce o se retarda la disminución de la concentración de estas hormonas peptídicas, en el tratamiento de diabetes mellitus.

[0012] La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que una reducción de la actividad de DP IV que actúa en el circuito sanguíneo conduce causalmente a que se vea influenciado el nivel de azúcar en sangre. Se descubrió que

1. la reducción de actividad de DP IV tiene como consecuencia un relativo incremento de la estabilidad de las incretinas estimuladas por glucosa o aportadas externamente, es decir que mediante la aplicación de efectores de la DP IV reductores de la actividad puede controlarse la descomposición de las incretinas en la sangre;
2. una incrementada estabilidad a la descomposición biológica de las incretinas tiene como consecuencia una modificación del efecto de la insulina endógena;
3. el incremento de la estabilidad de las incretinas que se logra en la sangre gracias a la reducción de la actividad de DP IV redundando en una consecutiva modificación del efecto de la insulina inducida por glucosa y con ello conduce a una modulación controlable mediante efectores de la DP IV reductores de la actividad del nivel de glucosa en sangre.

[0013] La invención se refiere con ello a efectores de la actividad enzimática de la dipeptidil peptidasa IV (DP IV) reductores de la actividad destinados a ser usados para bajar el nivel de azúcar en sangre bajo la concentración de glucosa característica de la hiperglucemia en el suero de un organismo mamífero para la mitigación de la diabetes mellitus.

[0014] Los efectores de la DP IV reductores de la actividad que se aplican según la invención pueden llegar a ser usados en complejos de formulación aplicables farmacéuticamente como inhibidores, sustratos, pseudosustratos, inhibidores de la expresión de DP IV, proteínas de unión o anticuerpos de estas proteínas enzimáticas o combinaciones de estas distintas sustancias, que reducen la concentración de la proteína DP IV en el organismo mamífero. Son efectores reductores de la actividad según la invención p. ej. inhibidores de DP IV como los derivados dipeptídicos o

miméticos dipeptídicos alanil-pirrolidida e isoleucil-tiazolidida, así como el pseudosustrato N-valil-prolil, O-benzoilhidroxilamina. Compuestos de este tipo son conocidos por la literatura [DEMUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. J. Enzyme Inhibition 3, 249 (1990)] o bien son producibles en analogía a los métodos descritos en la literatura.

[0015] El procedimiento que se hace público representa un novedoso enfoque para la disminución de la concentración incrementada de glucosa en sangre en el suero de mamíferos. Es sencillo, explotable comercialmente y adecuado para ser usado en la terapia en particular de enfermedades que se basan en valores de glucosa en sangre superiores a los medios, en la medicina humana.

[0016] Los efectores reductores de la actividad se administran en forma de preparados farmacéuticos que contienen el principio activo en combinación con habituales materiales de soporte conocidos por el estado de la técnica. Por ejemplo se aplican por vía parenteral (p. ej. *i.v.* en solución de sal común fisiológica) o bien por vía enteral (p. ej. oral, combinados con habituales materiales de soporte, como p. ej. glucosa).

[0017] En dependencia de su estabilidad endógena y de su biodisponibilidad, deben administrarse dosis únicas o bien también dosis múltiples de los efectores reductores de la actividad, para lograr la deseada normalización de los valores de glucosa en sangre. P. ej. en el caso de las aminoacil-tiazolididas una gama de dosis de este tipo puede estar situada entre 1,0 mg y 10,0 mg de sustancia efectora.

Figuras:

[0018]

Fig. 1: Análisis MALDI-TOF de la hidrólisis de GIP₁₋₄₂ (b) y GLP-1₇₋₃₆ catalizada por DP IV y su inhibición mediante isoleucil-tiazolidida (a).

Fig. 2: Análisis por HPLC de la presencia en suero de metabolitos de GLP-1 en presencia y en ausencia del inhibidor de DP IV isoleucil-tiazolidida *in vivo*.

Fig. 3: Influencia del inhibidor de la DP IV isoleucil-tiazolidida en distintos parámetros hemáticos de la rata estimulada con glucosa *i.d.*

Ejemplos de realización

Ejemplo 1: Inhibición de la hidrólisis de las incretinas GIP₁₋₄₂ y GLP-1₇₋₃₆ catalizada por DP IV in situ

[0019] Tanto *in vitro* con enzima purificada como también *in situ*, p. ej. en suero humano combinado, puede demostrarse o suprimirse con ayuda de inhibidores la hidrólisis de las incretinas ocasionada por la actividad de DP IV (Fig. 1).

[0020] Según la invención, en la incubación de GIP₁₋₄₂ 30µM y de GLP-1₇₋₃₆ 30µM e isoleucil-tiazolidida 20µM (1a), un inhibidor de DP IV reversible, se logra *in situ* en suero al 20% a un pH de 7,6 y a 30°C la completa supresión de la hidrólisis catalizada enzimáticamente de ambas hormonas peptídicas dentro de un periodo de tiempo de 24 horas (sendos espectros superiores 1b y 1c). Se incubaron con suero humano (al 20%) en tampón de TRICINA 0,1mM a un pH de 7,6 y a 30°C y por espacio de 24 horas GIP₁₋₄₂ (5µM) sintético y GLP-1₇₋₃₆ (15µM) sintético. Se tomaron tras distintos periodos de tiempo muestras de las preparaciones de incubación (para el GIP₁₋₄₂ 2,5 pmoles y en el caso del GLP-1₇₋₃₆ 7,5 pmoles). Las muestras fueron cocrystalizadas con 2',6'-dihidroxiacetofenona como matriz y se analizaron mediante MALDI-TOF-espectrometría de masas. Los espectros (Fig. 1) representan acumulaciones de 250 disparos láser individuales.

(1b) Las señales en la zona de m/z 4980,1 ± 5,3 corresponden al GIP₁₋₄₂ (M 4975,6) y en la zona de m/z 4745,2 ± 5,5 corresponden al producto de hidrólisis con DP IV GIP₃₋₄₂ (M 4740,4).

(1c) Las señales en m/z 3325,0 ± 1,2 corresponden al GLP-1₇₋₃₆ (M 3297,7) y en m/z 3116,7 ± 1,3 corresponden al producto de hidrólisis con DP IV GLP-1₉₋₃₆ (M 3089,6).

[0021] En las preparaciones de ensayo sin inhibidor las incretinas fueron descompuestas casi por completo en este periodo de tiempo (Figs. 1b y 1c, sendos espectros inferiores).

Ejemplo 2: Inhibición de la descomposición de GLP-1₇₋₃₆ mediante el inhibidor de la DP IV isoleucil-tiazolidida in vivo.

[0022] Si se sigue el metabolismo de las incretinas nativas (aquí GLP-1₇₋₃₆) en el suero de la rata en dependencia y en presencia del inhibidor de la DP IV isoleucil-tiazolidida (inyección *i.v.* de una solución de inhibidor 1,5µM en solución de sal común al 0,9%) frente a un control, para una concentración del inhibidor isoleucil-tiazolidida de aprox. 0,1 mg/kg de rata de laboratorio no se observa en los animales de ensayo tratados con inhibidor ($n = 5$) a lo largo del espacio de tiempo de ensayo descomposición alguna de la hormona peptídica insulínica GLP-1₇₋₃₆ (Fig. 2).

[0023] Para la detección de los metabolitos en presencia y en ausencia del inhibidor de la DP IV (20 minutos después de la previa administración *i.v.* de la dosis de inhibidor y de solución de sal común) los animales de ensayo y de control

recibieron por vía *i.v.* ^{125}I -GLP-1₇₋₃₆ 50 – 100pM (actividad específica aprox. 1 μM Ci/pM). Se tomaron muestras de sangre tras 2 – 5 min. y el plasma se sometió a extracción mediante acetonitrilo al 20%. A continuación fue separado el extracto peptídico mediante RP-HPLC y la radiactividad de las fracciones fue analizada en un contador γ . La actividad hallada está indicada en cpm (*cuentas por minuto*) con respecto al máximo.

5

Ejemplo 3: Modulación del efecto de la insulina y descenso del nivel de glucosa en sangre tras la aplicación i.v. del inhibidor de la DP IV isoleucil-tiazolidida in vivo.

[0024] En la rata estimulada por glucosa mediante inyección intraduodenal (*i.d.*), mediante dosis *i.v.* de distintos efectores de la DP IV, p. ej. de 0,1 mg de isoleucil-tiazolidida por kg de rata, puede observarse un descenso del nivel de glucosa que es debido a la acción inhibitoria y se produce con retardo en el tiempo. Este efecto es dosis-dependiente y reversible tras ser suspendida la infusión de 0,05 mg/min. del inhibidor de la DP IV isoleucil-tiazolidida por kg de rata. La aplicación *i.v.* de la misma cantidad de glucosa de animales tratados con inhibidor y de control no muestra contrariamente a los animales de ensayo estimulados por glucosa *i.d.* efecto equiparable alguno.

15

[0025] La Figura 3 aclara estas relaciones con las modificaciones inhibitor-dependientes de los parámetros plasmáticos: A – actividad de DP IV, B – nivel de insulina en plasma, C – nivel de glucosa en sangre.

[0026] Los animales de ensayo (n = 5, ratas Wistar macho, de 200 – 225 g) recibieron como dosis inicial isoleucil-tiazolidida 1,5 μM en solución de sal común al 0,9% (A) o iguales volúmenes de solución de sal común al 0,9% sin inhibidor (■) (grupo de control, n = 5). El grupo de ensayo recibió además una infusión del inhibidor de 0,75 SM/min. a lo largo de un tiempo de ensayo de 30 min. (*). Al grupo de control le fue en el mismo espacio de tiempo infundida una solución de sal común al 0,9% exenta de inhibidor. En el punto en el tiempo t = 0 los animales recibieron por vía *i.d.* una dosis de glucosa de 1 g/kg de solución de dextrosa al 40% (en peso/volumen).

25

[0027] A todos los animales de ensayo les fueron tomadas muestras de sangre a intervalos de tiempo de diez minutos.

[0028] Las mediciones de glucosa se hicieron en la sangre total (Lifescan One Touch II analyzer), mientras que la actividad de DP IV y las concentraciones de insulina se determinaron en el plasma.

30

[0029] La prueba de insulina aquí usada es sensible entre 10 y 160 mU/ml [PEDERSON, R.A., BUCHAN, A.M.J., ZAHEDI-ASH, S., CHEN, C.B. and BROWN, J.C. Reg. Peptides. 3, 53-63 (1982)]. La actividad de DP IV fue determinada mediante análisis espectral fotométrico [DEMUTH, H.-U- and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV, in Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. Todos los valores de medición están indicados como valores medios con la desviación estándar.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Efecto de la actividad enzimática de la dipeptidil-peptidasa IV (DP IV) reductor de la actividad destinado a ser usado para bajar el nivel de azúcar en sangre bajo la concentración de glucosa característica de la hiperglucemia en el suero de un organismo mamífero para mitigar la diabetes mellitus, en donde dicho efecto conduce a un reducida descomposición de los péptidos insulínótropicos endógenos GIP₁₋₄₂ y GLP-1₇₋₃₆ por la DP IV.
- 10 2. Efecto reductor de la actividad destinado a ser usado según la reivindicación 1, en donde dicho efecto es un inhibidor de la DP IV.
3. Efecto reductor de la actividad destinado a ser usado según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho efecto es aplicado por vía parenteral o enteral.
- 15 4. Efecto reductor de la actividad destinado a ser usado según la reivindicación 3, en donde dicho efecto es aplicado por vía oral con materiales de soporte habituales.

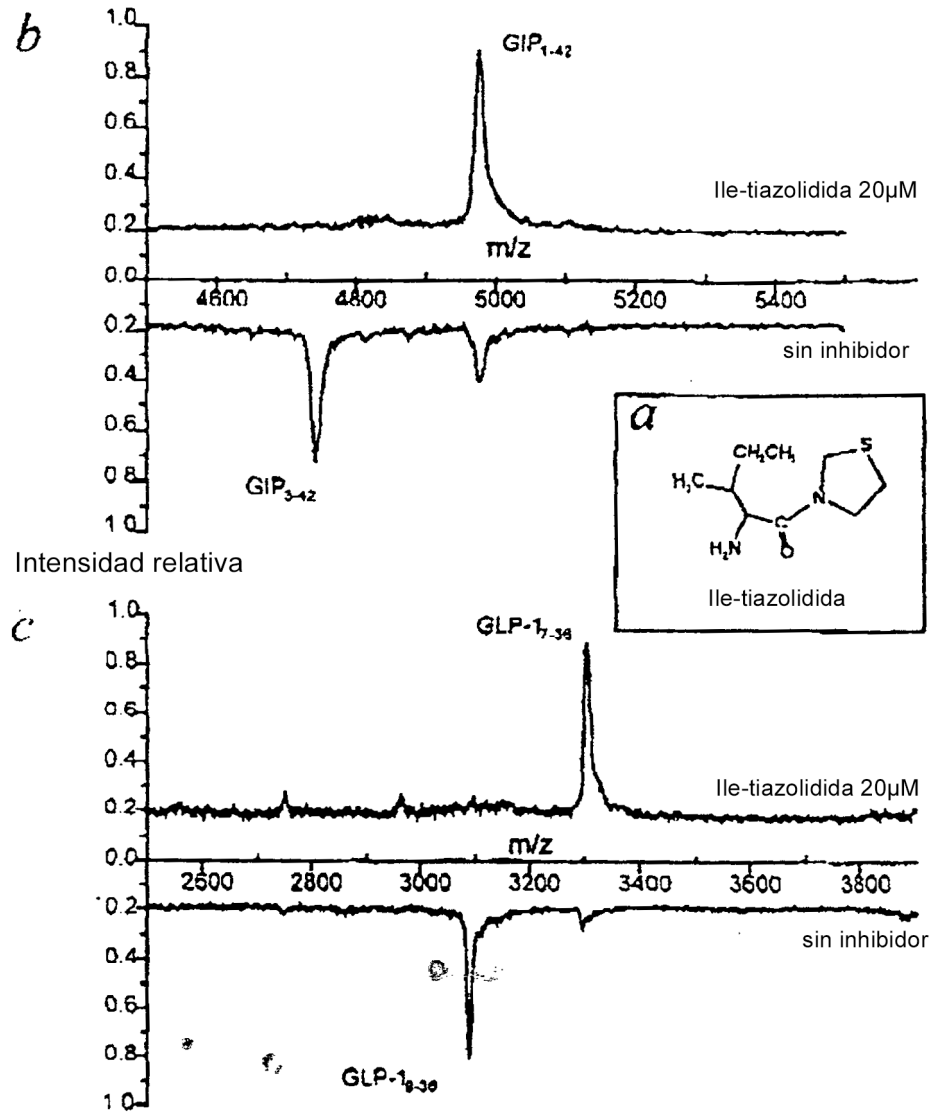


Fig. 1:

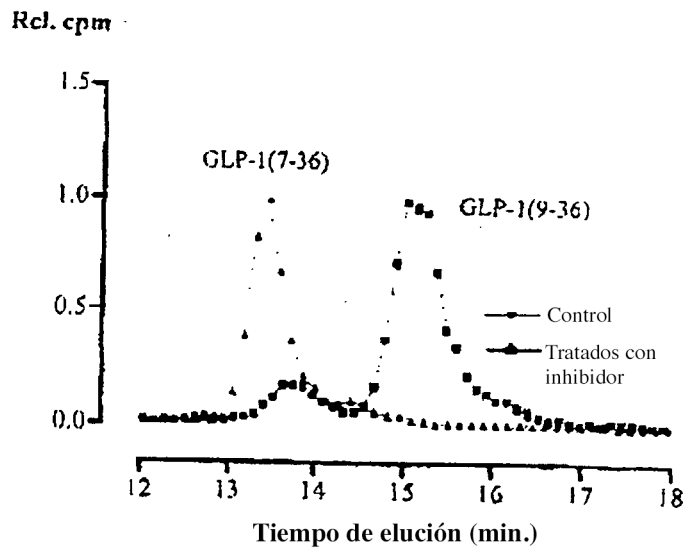


Fig. 2:

:
i

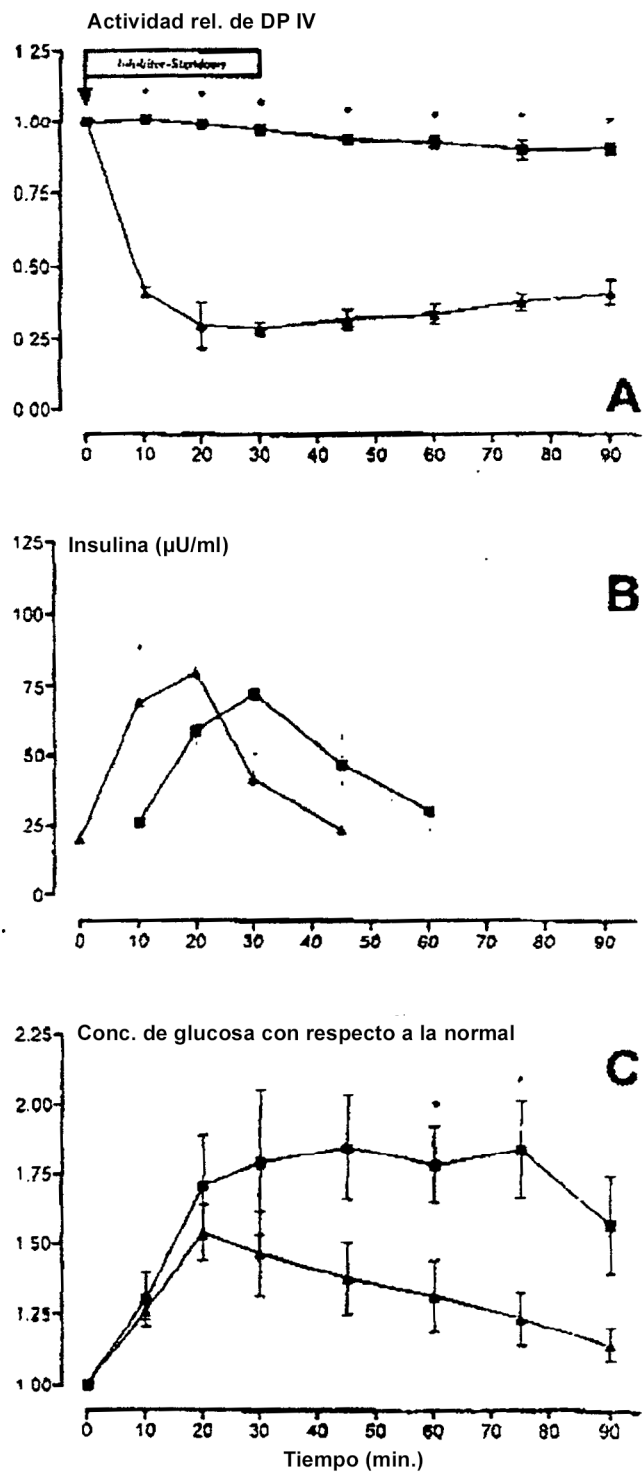


Fig. 3: