



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 290 029**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/26** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00928616 .2**  
86 Fecha de presentación : **01.05.2000**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1187628**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.03.2002**

54 Título: **Intervención metabólica con GLP-1 o sus análogos biológicamente activos para mejorar la función del cerebro con isquemia y reperusión.**

30 Prioridad: **30.04.1999 US 303016**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.02.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2008**

73 Titular/es: **AMYLIN PHARMACEUTICALS, Inc.**  
**9360 Towne Centre Drive**  
**San Diego, California 92121, US**

72 Inventor/es: **Coolidge, Thomas, R. y**  
**Ehlers, Mario, R., W.**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 290 029 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

Intervención metabólica con GLP-1 o sus análogos biológicamente activos para mejorar la función del cerebro con isquemia y reperfusión.

5

**Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un tratamiento eficaz para mejorar la función del cerebro con isquemia y reperfusión.

10 **Antecedentes de la invención**

Los ictus, o accidentes cerebrovasculares, son el resultado de una obstrucción aguda de la circulación sanguínea cerebral en una región del cerebro. Hay aproximadamente 500.000 casos cada año en los Estados Unidos, de los cuales el 30% son mortales, y así el accidente cerebrovascular es la tercera causa principal de muerte en los Estados Unidos. Aproximadamente el 80% de los accidentes cerebrovasculares son “isquémicos” y resultan de una oclusión aguda de una arteria cerebral (normalmente un coágulo o un trombo), con la reducción resultante en la circulación sanguínea. El resto son “hemorrágicos”, que son debidos a la ruptura de una arteria cerebral con hemorragia en el tejido cerebral y obstrucción consecuente del flujo sanguíneo debido a una compresión local del tejido, que crea isquemia.

El accidente cerebrovascular afecta comúnmente a individuos con más de 65 años, y el factor de riesgo más poderoso es la hipertensión. Sin embargo, existen fuertes factores de riesgo adicionales, de los cuales el más importante es la diabetes mellitus, que confiere un aumento del riesgo de dos a tres veces y se asocia con un aumento de la morbimortalidad tras un accidente cerebrovascular. Además, existe una fuerte evidencia de que la hiperglucemia *per se*, ya esté asociada con la diabetes o no, se correlaciona con un aumento de la morbimortalidad asociada con un accidente cerebrovascular, aunque la relación causal y los mecanismos subyacentes siguen siendo controvertidos.

Hasta hace poco tiempo, no había una terapia aprobada para el accidente cerebrovascular agudo, que se trataba mediante la asistencia médica general únicamente, seguido por rehabilitación del daño observado. En 1996, la FDA aprobó el uso del activador del plasminógeno tisular (tPA) como terapia para el accidente cerebrovascular isquémico agudo, basándose en un número limitado de ensayos controlados. Algunos de los ensayos, pero no todos, revelaron una mejora del 30-55% en el desenlace clínico, con una reducción global en la morbimortalidad. Este beneficio global se consiguió a pesar de un aumento notable del riesgo de hemorragia intracraneal (un 6,4% en los grupos tratados con tPA frente a un 0,64% en los tratados con placebo), la mitad de las cuales fueron mortales. Debido a las preocupaciones sobre la seguridad y eficacia variable, no se ha adoptado mundialmente la terapia trombolítica con tPA por los médicos que tratan el accidente cerebrovascular isquémico agudo. En la actualidad, la terapia trombolítica se limita eficazmente a los centros principales con expertos especializados en el tratamiento del accidente cerebrovascular agudo, y se limita a pacientes que no tienen evidencia de infarto mayor en una exploración mediante TAC, tienen menos de 70 años de edad, y carecen de estados médicos principales incluyendo la diabetes. Como resultado, sólo aproximadamente el 1,5% de los pacientes que podrían ser candidatos para la terapia con tPA realmente los recibe. Es probable que esta situación mejore cuando se acumule experiencia clínica con su uso y se defina más claramente el subconjunto de pacientes que es más probable que se beneficie. Además, existe una evidencia creciente de que la reperfusión espontánea tras un accidente cerebrovascular isquémico mejora el desenlace, lo que respalda la lógica de poner en práctica la terapia de reperfusión.

A partir de estas consideraciones, es evidente que existe una enorme necesidad insatisfecha de nuevas terapias eficaces para el accidente cerebrovascular agudo. Esto ha estimulado una intensa investigación en la identificación de estrategias que puedan proporcionar neuroprotección durante el periodo de isquemia (ya se deba a accidentes cerebrovasculares isquémicos o hemorrágicos), y terapias que bloqueen la lesión por reperfusión tras la revascularización en accidentes cerebrovasculares isquémicos. El objetivo es rescatar las neuronas en la denominada penumbra isquémica que rodea el núcleo infartado. Los agentes candidatos se clasifican en tres grupos principales: inhibidores de la excitotoxicidad; inhibidores de la adhesión de leucocitos y factores neurotróficos. En el primer grupo, la mayor parte de los esfuerzos se dirigen al bloqueo de la acción del neurotransmisor excitotóxico glutamato, principalmente bloqueando la clase de NMDA de los receptores de glutamato. Otras estrategias incluyen el bloqueo de los canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> y la eliminación del óxido nítrico.

La segunda estrategia, el bloqueo de la adhesión de leucocitos, se basa en la premisa de que los neutrófilos y los monocitos contribuyen significativamente a la lesión por reperfusión y a la extensión del infarto, y puede evitarse que entren en la zona isquémica administrando inhibidores de las moléculas de adhesión y citocinas inflamatorias relevantes (Jean *et al.*, 1998).

La tercera estrategia supone la administración de factores neurotróficos que pueden proteger las neuronas proporcionando un soporte tráfico general durante los periodos tanto isquémicos como de reperfusión. Se incluyen en este grupo de agentes el factor de crecimiento de fibroblastos básico y la insulina. Numerosos estudios han demostrado que la insulina puede ejercer potentes efectos neuroprotectores en una variedad de modelos de accidente cerebrovascular. Sin embargo, el uso de la insulina es complicado por la incertidumbre que rodea a los efectos neurotóxicos de la hiperglucemia, los posibles beneficios de una hipoglucemia de leve a moderada, y los efectos potencialmente mortales de la hipoglucemia grave.

Según esta invención, puede observarse que existe una necesidad real y continuada de un tratamiento eficaz para mejorar la función del cerebro con isquemia y reperfusión. Esta invención tiene como objeto primario el cumplimiento de esta necesidad.

5 Otro objeto de la presente invención es tratar el cerebro con isquemia o reperfusión con GLP-1 o sus análogos biológicamente activos tras un accidente cerebrovascular agudo o hemorragia para optimizar la secreción de insulina, potenciar la eficacia de la insulina suprimiendo el antagonismo del glucagón, y mantener la euglucemia o hipoglucemia leve sin riesgo de hipoglucemia grave.

10 Otro objetivo de la presente invención es conseguir los objetivos anteriores con una composición que no proporcione un riesgo de hipoglucemia grave, y pueda corregir la hiperglucemia.

Todavía un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un tratamiento con un compuesto biológicamente activo que no ofrece riesgos de ningún efecto secundario, sea cual sea.

15 Los medios y la manera de conseguir cada uno de los objetivos anteriores resultarán evidentes a partir de la descripción detallada de la invención que sigue a continuación en el presente documento.

### Sumario de la invención

20 La presente invención se refiere al uso del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) o un análogo biológicamente activo del mismo para la fabricación de una composición farmacéutica para mejorar la lesión del tejido cerebral producida por reperfusión del flujo sanguíneo tras un periodo de isquemia.

25 Según un aspecto de la invención, el péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13. Preferiblemente, el péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo es SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9.

30 Según un aspecto adicional de la invención, el péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:6. Preferiblemente, el péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo es SEQ ID NO:4.

35 Según la invención, el periodo de isquemia puede estar producido por un accidente cerebrovascular o por una intervención quirúrgica.

Preferiblemente la composición farmacéutica comprende también un vehículo farmacéutico que puede seleccionarse del grupo que consiste en solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, lactosa, fosfato, manitol, arginina, trehalosa, y combinaciones de los mismos.

40 La composición farmacéutica puede ser para una administración que comienza en el plazo de 4 horas de un acontecimiento isquémico. Preferiblemente, La composición farmacéutica es para una administración que comienza en el plazo de 4 horas de un acontecimiento isquémico y es continua después.

45 Según una realización preferida, la composición farmacéutica puede ser para la infusión intravenosa continua a un nivel de dosis de 0,1 pmol/kg/min a 10 pmol/kg/min de dicho péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo. Según una realización preferida adicional, la composición farmacéutica es para la infusión subcutánea continua a una dosis de 0,1 pmol/kg a 75 pmol/kg del péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo. Según una realización preferida adicional, la composición farmacéutica es para una única inyección intravenosa a un nivel de dosis de 0,1 nmol/kg a 2,0 nmol/kg de dicho péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo. Según una realización preferida adicional, la composición farmacéutica es para una única inyección subcutánea a un nivel de dosis de 0,1 nmol/kg a 100 nmol/kg de dicho péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo.

55 Alternativamente, la composición farmacéutica puede ser para la administración mediante inyección subcutánea, inyección por micropresión, insuflación en las áreas distales del pulmón (“deep lung”), bomba externa, bomba para implantación, inyección de depósito (“depot”), administración bucal, administración a través de la piel o administración a través de la membrana.

### 60 Descripción detallada de la invención

Numerosos estudios con animales y seres humanos han revelado una fuerte correlación entre la hiperglucemia y la gravedad de la morbimortalidad relacionada con un accidente cerebrovascular. Sin embargo, existe un desacuerdo considerable sobre si los niveles elevados de glucosa en sangre contribuyen realmente a la lesión neuronal durante la isquemia, o si la hiperglucemia es meramente una respuesta de estrés secundaria a la lesión neuronal. Un estudio de seguimiento retrospectivo revente de 811 pacientes con accidente cerebrovascular agudo en el R.U., concluyó que la hiperglucemia prevé una morbimortalidad superior independientemente de otros factores pronóstico adversos y, por tanto, puede relacionarse de manera causal con el daño neuronal. Sin embargo, esta conclusión ha sido cuestionada

por algunos en términos estadísticos, y existe un consenso en ciertos ámbitos de que la hiperglucemia en pacientes con accidente cerebrovascular es reactiva al daño cerebral más que causante. No obstante, es notable que del 20% al 43% de los pacientes con accidente cerebrovascular agudo están hiperglucémicos en la presentación. Esto puede explicarse, en parte, por diabetes preexistente (del 25% al 50% de pacientes hiperglucémicos), pero en la mayoría esto parecer ser un reflejo de una respuesta de estrés aguda con un aumento de la producción de cortisol, glucagón y catecolaminas. No puede contestarse definitivamente en la actualidad si la hiperglucemia resultante está relacionada, de hecho, de manera causal con la lesión neuronal en pacientes humanos con accidente cerebrovascular.

Los intentos para aclarar el papel de la hiperglucemia en la producción del daño neuronal se han centrado en modelos animales apropiados de accidente cerebrovascular agudo. Estos estudios han revelado que en los modelos de rata de isquemia cerebral focal transitoria seguido por reperfusión (un modelo relevante para la situación clínica del accidente cerebrovascular tratado mediante revascularización con tPA) parece que la hiperglucemia está relacionada de manera causal con el aumento del daño neuronal. Comparado con la isquemia focal, los modelos de isquemia global, inducida o bien mediante paro cardíaco transitorio o bien mediante oclusión de vasos bilaterales en ratas, revelaron un efecto neurotóxico menos significativo de la hiperglucemia. Los experimentos en estos modelos de isquemia global han revelado que la normo o hipoglucemia inducida por insulina son neuroprotectoras, pero que estos efectos parecen estar mediados por la insulina directamente, independientemente de su acción hipoglucemiante. Por tanto, los experimentos en animales indican que los efectos neuronales de la glucemia durante y tras un accidente cerebrovascular agudo son complejos, y dependen tanto de la extensión de la zona isquémica como del momento de las manipulaciones de la glucemia.

Las consecuencias de los acontecimientos de isquemia-reperfusión, ya sean focales o globales, son daño de las células cerebrales irreversible y reversible, muerte celular, y disminución de la eficacia funcional del órgano.

La paradoja del daño celular asociado con un periodo limitado de anoxia isquémica seguido por reperfusión es que la muerte y el daño celular no parecen resultar probablemente sólo del periodo de carencia de oxígeno sino, adicionalmente, como consecuencia de la reoxigenación de los tejidos que se vuelven altamente sensibles al daño oxidativo durante el periodo isquémico. El daño por reperfusión comienza con el estallido oxidativo inicial inmediatamente con el nuevo flujo y continúa empeorando durante varias horas a medida que se desarrollan procesos inflamatorios en los mismos tejidos tras la isquemia. Los esfuerzos dedicados a disminuir la sensibilidad de células tras anoxia al daño oxidativo y, adicionalmente, los esfuerzos para reducir las respuestas inflamatorias en estos mismos tejidos han demostrado reducir el daño reversible e irreversible en los órganos con reperfusión tras anoxia. Una combinación de métodos para reducir tanto la lesión por el estallido oxidativo inicial como el daño asociado a la inflamación posterior podría proporcionar una protección sinérgica frente a la lesión por reperfusión. GLP-1, y sus análogos biológicamente activos, pueden conseguir esto creando un fuerte efecto anabólico sobre las células cerebrales.

Además de GLP-1 o sus análogos biológicos, la terapia puede incluir el uso de eliminadores de radicales libres tales como glutatión, melatonina, vitamina E y superóxido dismutasa (SOD). En esta combinación, incluso se disminuye adicionalmente el riesgo de daño por reperfusión.

Con respecto al tratamiento de tales pacientes, una terapia común usada hoy en día es emplear trombolíticos tales como estreptocinasa y t-PA. La patente estadounidense número 4.976.959 describe la administración de t-PA y SOD para inhibir el daño tisular durante la reperfusión. Por tanto, un número creciente de pacientes está expuesto a la posibilidad de lesión por reperfusión y sus efectos que resultan de intervenciones trombolíticas.

Los inventores han aquí descubierto que la administración de GLP-1 humano, o sus análogos biológicamente activos, potenciaba o restauraba las respuestas de secreción de insulina, siendo la insulina neuroprotectora, probablemente mediante efectos neurotróficos directos, así como controlando la hiperglucemia relacionada con el accidente cerebrovascular.

El término "GLP-1", o péptido similar al glucagón, incluye miméticos de GLP-1 y sus análogos biológicamente activos tal como se usa en el contexto de la presente invención, y puede estar compuesto por péptidos similares al glucagón y péptidos y análogos relacionados del péptido similar al glucagón 1 que se unen a una proteína receptora del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) tal como la proteína receptora de GLP-1 (7-36)-amida y tiene un efecto biológico correspondiente sobre la secreción de insulina como GLP-1 (7-36)-amida, que es una forma nativa, biológicamente activa de GLP-1. Véase Göke, B y Byrne, M, *Diabetic Medicine*. 1996, 13:854-860. Los receptores de GLP-1 son proteínas de la superficie celular que se encuentran, por ejemplo, en las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina. Los péptidos similares al glucagón y análogos incluirán especies que tienen actividad insulínica y que son agonistas de, es decir activan, la molécula receptora de GLP-1 y su actividad de segundo mensajero en, entre otros, las células  $\beta$  productoras de insulina. Se han descrito agonistas del péptido similar al glucagón que muestran actividad a través de este receptor: documento EP 0708179A2; Hjorth, S.A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269 (48):30121-30124 (1994); Siegel, E.G. *et al.* Amer. Diabetes Assoc. 57th Scientific Sessions, Boston (1997); Hareter, A. *et al.* Amer. Diabetes Assoc. 57th Scientific Sessions, Boston (1997); Adelhorst, K. *et al.* *J. Biol. Chem.* 269 (9):6275-6278 (1994); Deacon C.F. *et al.* 16th International Diabetes Federation Congress Abstracts, *Diabetologia Supplement* (1997); Irwin, D.M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:7915-7920 (1997); Mosjov, S. *Int. J. Peptide Protein Res.* 40:333-343 (1992). Las moléculas similares al glucagón incluyen polinucleótidos que expresan agonistas de GLP-1, es decir activadores de la molécula receptora de GLP-1 y su actividad de segundo mensajero que se encuentran en, entre otros, las células  $\beta$  productoras de insulina. Los miméticos de GLP 1 que también son agonistas de las células  $\beta$  incluyen, por ejemplo,

compuestos químicos diseñados específicamente para activar el receptor de GLP-1. Publicaciones recientes describen Black Widow GLP-1 y Ser<sup>2</sup> GLP-1, véanse G.G. Holz, J.F. Hakner/*Comparative Biochemistry and Physiology*, Parte B 121(1998)177-184 y Ritzel, *et al.*, *A Synthetic glucagon-like peptide- 1 analog with improved plasma stability*, *J. Endocrinol* oct. de 1998; 159(1):93-102. También se conocen antagonistas del péptido similar al glucagón 1, por ejemplo véase por ejemplo Watanabe, Y. *et al.*, *J. Endocrinol.* 140(1):45-52 (1994), e incluyen exendina (9-39)-amina, un análogo de exendina, que es un potente antagonista de los receptores de GLP-1 (véase por ejemplo el documento WO97/46584). Las realizaciones adicionales incluyen polipéptidos similares al glucagón sintetizados químicamente así como cualquier polipéptido o fragmento del mismo que es sustancialmente homólogo. “Sustancialmente homólogo”, que puede referirse tanto a secuencias de ácidos nucleicos como de aminoácidos, significa que una secuencia objeto particular, por ejemplo, una secuencia mutante, varía de una secuencia de referencia en una o más sustituciones, deleciones o adiciones, cuyo efecto neto no da como resultado una disimilitud funcional adversa entre las secuencias de referencia y objeto. Para los fines de la presente invención, las secuencias que tienen una homología superior al 50 por ciento, y preferiblemente una homología superior al 90 por ciento, actividad biológica equivalente en aumentar las respuestas de las células  $\beta$  a los niveles de glucosa en plasma, y características de expresión equivalentes se consideran sustancialmente homólogas. Para los fines de determinar la homología, debe ignorarse el truncamiento de la secuencia madura. Las secuencias que tienen grados de homología menores, bioactividad comparable y características de expresión equivalentes se consideran equivalentes.

El glucagón y los péptidos GLP de mamíferos están codificados por el mismo gen. En el íleon, se procesa el fenotipo en dos clases principales de hormonas peptídicas GLP, concretamente GLP-1 y GLP-2. Se conocen cuatro péptidos relacionados con GLP-1 que se procesan a partir de los péptidos fenotípicos. GLP-1 (1-37) tiene la secuencia His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly (SEQ. ID NO: 1). GLP-1 (1-37) se amida mediante procesamiento postraduccional para producir GLP-1 (1-36)-NH<sub>2</sub> que tiene la secuencia His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg (NH<sub>2</sub>) (SEQ. ID NO:2); o se procesa enzimáticamente para producir GLP-1 (7-37) que tiene la secuencia His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly (SEQ. ID NO:3). GLP-1 (7-37) también puede amidarse para producir GLP-1 (7-36)-amida que es la forma natural de la molécula de GLP-1, y que tiene la secuencia His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg (NH<sub>2</sub>) (SEQ. ID NO:4) y en la forma natural de la molécula de GLP-1.

Las células L intestinales secretan GLP-1 (7-37) (SEQ. ID NO:3) y GLP-1 (7-36)NH<sub>2</sub> (SEQ. ID NO:4) en una razón de 1 a 5, respectivamente. Estas formas truncadas de GLP-1 tienen cortas semividas *in situ*, es decir, inferiores a 10 minutos, y se inactivan por una aminodipeptidasa IV para producir Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly (SEQ. ID NO: 5); y Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg (NH<sub>2</sub>) (SEQ. ID NO: 6), respectivamente. Se ha especulado que los péptidos Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly (SEQ. ID NO:5) y Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg (NH<sub>2</sub>) (SEQ. ID NO:6) afectan a la producción de glucosa hepática, pero no estimulan la producción ni la liberación de insulina por el páncreas.

Hay seis péptidos en los venenos del monstruo de Gila que son homólogos a GLP-1. Se comparan sus secuencias con la secuencia de GLP-1 en la tabla 1.

(Tabla pasa a página siguiente)

# ES 2 290 029 T3

TABLA 1

5	a. H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R NH <sub>2</sub>
10	b. H S D G T F T S D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N G G P S S G A P P P S NH <sub>2</sub>
15	c. D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N G G P S S G A P P P S NH <sub>2</sub>
20	d. H G E G T F T S D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N G G P S S G A P P P S NH <sub>2</sub>
25	e. H S D A T F T A E Y S K L L A K L A L Q K Y L E S I L G S S T S P R P P S S
30	f. H S D A T F T A E Y S K L L A K L A L Q K Y L E S I L G S S T S P R P P S
35	g. H S D A I F T E E Y S K L L A K L A L Q K Y L A S I L G S R T S P P P NH <sub>2</sub>
40	h. H S D A I F T Q Q Y S K L L A K L A L Q K Y L A S I L G S R T S P P P NH <sub>2</sub>
45	a=GLP-1 (SEQ. ID NO:4). b=Exendina 3 (SEQ. ID NO:7). c=Exendina 4 (9-39) (NH <sub>2</sub> ) (SEQ. ID NO:8). d=Exendina 4 (SEQ. ID NO:9). e=Helospectina I (SEQ. ID NO:10). f=Helospectina II (SEQ. ID NO:11). g=Helodermina (SEQ. ID NO:12). h=Q <sup>8</sup> , Q <sup>9</sup> -Helodermina (SEQ. ID NO: 13).

50 Las principales homologías indicadas por las zonas expuestas en la tabla 1 son: los péptidos c y h se derivan de d y g, respectivamente. Los 6 péptidos que se producen de manera natural (a, b, d, e, f y g) son homólogos en las posiciones 1, 7, 11 y 18. GLP-1 y las exendinas 3 y 4 (a, b y d) son homólogos además en las posiciones 4, 5, 6, 8, 9, 15, 22, 23, 25, 26 y 29. En la posición 2, A, S y G son estructuralmente similares. En la posición 3, los residuos D y E (Asp y Glu) son estructuralmente similares. En las posiciones 22 y 23, F (Phe) y I (Ile) son estructuralmente similares a Y (Tyr) y L (Leu), respectivamente. Asimismo, en la posición 26, L e I son estructuralmente equivalentes.

60 Por tanto, de los 30 residuos de GLP-1, las exendinas 3 y 4 son idénticas en 15 posiciones y equivalentes en 5 posiciones adicionales. Las únicas posiciones en las que son evidentes cambios estructurales radicales son en los residuos 16, 17, 19, 21, 24, 27, 28 y 30. Las exendinas también tienen 9 residuos extra en el extremo carboxilo-terminal.

65 Los péptidos similares a GLP-1 pueden prepararse mediante síntesis química de péptidos en estado sólido. También puede prepararse GLP-1 mediante técnicas recombinantes convencionales usando los procedimientos habituales descritos, por ejemplo, en Sambrook y Maniatis. "Recombinante", tal como se utiliza en el presente documento, significa que una proteína se deriva de sistemas de expresión recombinantes (por ejemplo, microbiano o de mamíferos) que se han modificado genéticamente para contener un gen de expresión para GLP-1 o sus análogos biológicamente activos.

Los péptidos similares a GLP-1 pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácidos, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. También puede emplearse la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para las etapas de purificación finales.

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser un producto purificado de manera natural, o un producto de procedimientos de síntesis química, o producirse mediante técnicas recombinantes a partir de huéspedes procariotas o eucariotas (por ejemplo mediante células de bacterias, levaduras, plantas superiores, insectos y mamíferos en cultivo o *in vivo*). Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención generalmente no están glucosilados, pero pueden glucosilarse.

Puede determinarse la actividad de GLP-1 mediante métodos habituales, en general, mediante procedimientos de selección de actividad de unión al receptor que suponen proporcionar células apropiadas que expresan el receptor de GLP-1 en su superficie, por ejemplo, líneas celulares de insulinoma tales como células RINmSF o células INS-1. Véanse también Mosjov, S. (1992) y el documento EP07J8170A2. Además de medir la unión específica de un trazador a la membrana usando métodos de radioinmunoanálisis, también puede medirse la actividad de AMPc o la producción de insulina dependiente de glucosa. En un método, se emplea un polinucleótido que codifica para el receptor de la presente invención, para transfectar células para expresar así la proteína receptora de GLP-1. Así, por ejemplo, pueden emplearse estos métodos para seleccionar un agonista del receptor poniendo en contacto tales células con los compuestos que van a seleccionarse y determinando si tales compuestos generan una señal, es decir, activan el receptor.

Pueden utilizarse anticuerpos policlonales y monoclonales para detectar, purificar e identificar péptidos similares a GLP-1 para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Los anticuerpos tales como ABGA1178 detectan GLP-1 (1-37) sin corte y empalme intacto o GLP-1 (7-37) o (7-36)-amida truncados en el extremo N-terminal. Otros anticuerpos detectan en el propio final del extremo C-terminal de la molécula precursora, un procedimiento que permite mediante sustracción calcular la cantidad de péptido truncado biológicamente activo, es decir GLP-1 (7-37) o (7-36)-amida (Orskov *et al.* Diabetes, 1993, 42:658-661; Orskov *et al. J. Clin. Invest.* 1991, 87:415-423).

Otras técnicas de selección incluyen el uso de células que expresan el receptor de GLP-1, por ejemplo, células CHO transfectadas, en un sistema que mide el pH extracelular o cambios iónicos producidos por la activación del receptor. Por ejemplo, pueden ponerse en contacto posibles agonistas con una célula que expresa el receptor proteico de GLP-1 y puede medirse una respuesta de segundo mensajero, por ejemplo transducción de señales o cambios iónicos o de pH, para determinar si el posible agonista es eficaz.

Pueden usarse las proteínas que se unen al receptor del péptido similar al glucagón 1 de la presente invención en combinación con un vehículo farmacéutico adecuado. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Un vehículo de este tipo incluye, pero no se limita, a solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, lactosa, fosfato, manitol, arginina, trehalosa y combinaciones de los mismos. Las formulaciones deben adaptarse al modo de administración y se determinan fácilmente por los expertos en la técnica. El péptido GLP-1 también puede usarse en combinación con agentes conocidos en la técnica que aumentan la semivida *in vivo* del péptido con el fin de potenciar o prolongar la actividad biológica del péptido. Por ejemplo, puede unirse covalentemente una molécula o resto químico a la composición de la presente invención antes de la administración de la misma. Alternativamente, el agente de potenciación puede administrarse de manera concurrente con la composición. Todavía más, el agente puede comprender una molécula que se sabe que inhibe la degradación enzimática de los péptidos similares a GLP-1 puede administrarse de manera concurrente con o tras la administración de la composición de péptido GLP-1. Una molécula de este tipo puede administrarse, por ejemplo, por vía oral o mediante inyección.

El intervalo de dosis de las concentraciones que son eficaces depende algo del modo de administración, es decir, liberación sostenida o continua, tal como infusión intravenosa o infusión subcutánea. Sin embargo, puesto que GLP-1 no tiene efectos secundarios, puede tolerarse un margen considerable. Puede administrarse en una administración en bolo, o bien i.v. o bien subcutánea también.

Aunque no se limitan a los siguientes intervalos y se proporcionan sólo como una ilustración, los intervalos de dosis sugeridos para diversas aplicaciones son para la infusión continua por vía intravenosa (i.v.) de 0,1 pmol/kg/min a 10 pmol/kg/min y por vía subcutánea (s.c.) de 0,1 pmol/kg/min a 75 pmol/kg/min, y para una única inyección (bolo) por vía i.v. de 0,1 nmol/kg a 2,0 nmol/kg y por vía s.c. de 0,1 nmol/kg a 100 nmol/kg.

El método de administración preferido del péptido GLP-1 es a través de una aplicación continua a una velocidad de dosificación dentro de un intervalo de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 10 pmol/kg por minuto de GLP-1 administrado mediante métodos de liberación sostenida por vía subcutánea, intramuscular, interperitoneal, depósito inyectado con liberación sostenida, insuflación en las áreas distales del pulmón, así como por vía intravenosa, bucal, parche u otros métodos de administración con liberación sostenida.

Los posibles mecanismos de la neurotoxicidad debida a glucosa siguen siendo especulativos, y los solicitantes no desean restringirse a una teoría. Sin embargo, durante la isquemia cerebral, como en otros tejidos, se estimula la

glucolisis anaerobia y produce ácido láctico, que es probable que esté aumentado por la hiperglucemia. El lactato puede ser especialmente tóxico para las células neuronales isquémicas. Una segunda posibilidad es que la hiperglucemia produce un aumento de las fugas de glóbulos rojos a través del endotelio capilar isquémico, produciendo microinfartos hemorrágicos. Un tercer mecanismo que se ha sugerido es que la excitotoxicidad neuronal (por ejemplo, inducida por glutamato) es sensible a la glucosa y así la hiperglucemia aumenta esta potente fuente de daño neuronal. A pesar de no conocer el mecanismo preciso, el hecho es que el tratamiento con GLP-1 proporciona importantes beneficios.

De manera importante, y como medida preventiva del aumento del daño y el riesgo, GLP-1 puede y debe administrarse tan pronto como se detecte que se ha producido o está produciéndose un acontecimiento. Por tanto, puede administrarse en el domicilio o en una ambulancia para que su efecto anabólico inmediato mejore el metabolismo cerebral.

A partir de estas consideraciones, queda claro que una estrategia potencialmente importante al tratar un accidente cerebrovascular agudo y limitar el tamaño del infarto es controlar la hiperglucemia, reduciendo los niveles de glucemia hasta el intervalo normoglucémico o moderadamente hipoglucémico. Y, hasta ahora, el único medio práctico de tratar la hiperglucemia era con insulina.

Hasta la fecha, no se ha completado ningún ensayo con seres humanos controlado, aleatorizado que examine los beneficios del tratamiento con insulina pare. el accidente cerebrovascular agudo, aunque se han recomendado tales ensayos. Sin embargo, el riesgo de efectos secundarios de la insulina es demasiado grande. A diferencia de esta escasez de datos en ensayos con seres humanos, numerosos estudios han evaluado los efectos de la insulina en modelos animales de accidente cerebrovascular. Prácticamente sin excepción, estos estudios han documentado grandes beneficios, lo que indica que la insulina conserva la capacidad funcional, limita el tamaño del infarto y reduce la mortalidad tanto tras isquemia global como isquemia focal con reperfusión. En modelos de isquemia global, en los que estaban ocluidas las dos arterias carótidas, en algunos casos con hipotensión inducida, o en los que se indujo paro cardíaco por asfixia, la insulina tenía un notable efecto protector, limitando el tamaño del infarto, reduciendo el déficit neurológico y potenciando la recuperación metabólica. Además, el efecto de la insulina dependía enormemente de su acción hipoglucemiante; de hecho, la hipoglucemia profunda fue perjudicial de manera uniforme para la función cerebral y el desenlace.

En modelos de isquemia cerebral focal transitoria, la insulina tuvo de manera similar un fuerte efecto protector, reduciendo el volumen de infarto y la extensión de la necrosis cerebral, (Yip, PK, He, YY, Hsu, CY, Garg, N, Marangos, P, y Hogan, EL (1991) Effect of plasma glucose on infarct size in focal cerebral ischemia-reperfusion. *Neurology* 41, 899-905; Hamilton, MG, Tranmer, BI, y Auer, RN (1995) Insulin reduction of cerebral infarction due to transient focal ischemia. *J. Neurosurg.* 82, 262-268).

Se ha examinado mecanísticamente el poderoso efecto neuroprotector de la insulina por White y colaboradores (White, BC, Grossman, LI, y Krause, GS (1993) Brain injury by global ischemia and reperfusion: A theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology* 43, 1656-1665; White, BC, Grossman, LI, O'Neil, BJ, DeGracia, DJ, Neumar, RW, Rafols, JA, y Krause, GS (1996) Global brain ischemia and reperfusion. *Ann. Emerg. Med.* 27, 588-594). Estos autores han argumentado que la insulina actúa como un potente factor neurotrófico que puede activar las rutas generales de reparación neuronal que son independientes de sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa. Durante un accidente cerebrovascular, la mayor parte del daño estructural se produce durante la reperfusión. Esto se cree que surge de la lipólisis de membrana inducida por la isquemia, la acumulación local de ácidos grasos de membrana, y la posterior producción de superóxido durante la oxidación estimulada por la reperfusión de estos ácidos grasos. Los radicales de oxígeno generados por la reperfusión dañan entonces las membranas neuronales mediante peroxidación lipídica. Esta lesión se agrava por la supresión inducida por la reperfusión de la síntesis de proteínas, lo que anula los sistemas de reparación de la membrana. En esta situación, la insulina y otros miembros de la familia del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) tienen importantes efectos de rescate de neuronas mediante la estimulación de la síntesis de proteínas y la regulación por incremento de la maquinaria para la nueva síntesis de lípidos de membrana. Esto, a su vez, puede provenir de la desfosforilación estimulada por la insulina del factor de iniciación eucariota 2 (eIF-2 $\alpha$ ), fomentando así la traducción eficaz de transcritos de ARNm.

### Ejemplos

Según esta invención, el uso de GLP-1 (péptido similar al glucagón 1 [7-36]-amida) es una alternativa ideal a la insulina para el tratamiento de un accidente cerebrovascular agudo. Esto es debido a la acción insulino-trópica dependiente de glucosa de GLP-1. GLP-1 estimula la secreción endógena de insulina en presencia de normo a hiperglucemia, pero no durante la hipoglucemia, protegiendo así frente al desarrollo de hipoglucemia grave. Esto significa que en un diabético tipo II, el GLP-1 estimulará una secreción sostenida de insulina y tenderá a normalizar los niveles de glucemia. Estas dos acciones pueden ser de enorme beneficio en una situación de accidente cerebrovascular agudo. Pueden conseguirse resultados similares en pacientes no diabéticos con accidente cerebrovascular con hiperglucemia reactiva. En las víctimas de accidente cerebrovascular con euglucemia, GLP-1 dará como resultado una secreción de insulina moderada, que puede volver al nivel inicial en ausencia de glucosa complementaria. En tales casos, puede ser deseable coadministrar glucosa intravenosa (a dosis baja, por ejemplo del 5%, con el fin de mantener la estimulación de la secreción de insulina. Sin embargo, a diferencia de una infusión de glucosa-insulina, no habrá necesidad de un ajuste cuidadoso de la dosis, puesto que la acción dependiente de glucosa de GLP-1 da como resultado el "autoajuste" con el mantenimiento de la euglucemia unido a niveles circulantes elevados de insulina.

## ES 2 290 029 T3

No se cree que los AGL circulantes entren en el cerebro y no son una fuente de combustible para el cerebro. Cuando está totalmente oxigenado, el cerebro metaboliza glucosa exclusivamente, y sólo cambia a los cuerpos cetónicos provenientes del hígado durante el ayuno prolongado. Durante la isquemia, se ve afectada la oxidación aerobia de glucosa y se potencia la glucólisis, pero esto fracasa en la generación de suficiente ATP. Como resultado, se ven afectadas las funciones de la membrana, puede entrar  $\text{Ca}^{2+}$  en las células, y se estimula la lipólisis enzimática de fosfolípidos de la membrana neuronal, generando AGL intracerebrales. Estos AGL no se generan por la acción del glucagón. No obstante, la supresión de glucagón puede potenciar generalmente el medio metabólico, reduciendo el estado inducido por estrés de antagonismo de la insulina. Con la potenciación del medio metabólico, debe haber una supresión beneficiosa de la inflamación.

Puede observarse a partir de los ejemplos anteriores, que solamente son ilustrativos de un aspecto de la presente invención, que cumple todos sus objetivos establecidos. De manera importante, estos ejemplos no deben tomarse en modo alguno como una limitación de las enseñanzas o la descripción o el intervalo o equivalencia de la presente invención, ya que sólo son a modo de ejemplo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) o un análogo biológicamente activo del mismo para la fabricación de una composición farmacéutica para mejorar la lesión del tejido cerebral producida por reperfusión del flujo sanguíneo tras un periodo de isquemia.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo es SEQ ID NO:7 o SEQ ID NO:9.
4. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:6.
- 20 5. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo es SEQ ID NO:4.
6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho periodo de isquemia está producido por un accidente cerebrovascular.
- 25 7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el periodo de isquemia está producido por una intervención quirúrgica.
8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéutico.
- 30 9. Uso según la reivindicación 8, en el que dicho vehículo se selecciona del grupo que consiste en solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, lactosa, fosfato, manitol, arginina, trehalosa y combinaciones de los mismos.
- 35 10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición farmacéutica es para una administración que comienza en el plazo de 4 horas de un acontecimiento isquémico.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que dicha composición farmacéutica es para una administración que comienza en el plazo de 4 horas de un acontecimiento isquémico y es continua después.
- 40 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha composición farmacéutica es para la infusión intravenosa continua a un nivel de dosis de 0,1 pmol/kg/min a 10 pmol/kg/min de dicho péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo.
- 45 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha composición farmacéutica es para la infusión subcutánea continua a una dosis de 0,1 pmol/kg a 75 pmol/kg del péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo.
- 50 14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha composición farmacéutica es para una única inyección intravenosa a un nivel de dosis de 0,1 nmol/kg a 2,0 nmol/kg de dicho péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo.
- 55 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha composición farmacéutica es para una única inyección subcutánea a un nivel de dosis de 0,1 nmol/kg a 100 nmol/kg de dicho péptido similar al glucagón 1 o análogo biológicamente activo del mismo.
16. Uso según la reivindicación 12, en el que hay una administración concurrente de glucosa.
17. Uso según la reivindicación 12, en el que hay una administración concurrente de un eliminador de oxígeno.
- 60 18. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha composición farmacéutica es para la administración mediante inyección subcutánea, inyección por micropresión, insulación a las áreas distales el pulmón, bomba externa, bomba para implantación, inyección de depósito, administración bucal, administración a través de la piel o administración a través de la membrana.