

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2004-479

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

A 61 K 38/17

A 61 P 3/10

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15.10.2002**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.10.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/329330**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.01.2005**

(Věstník č. 1/2005)

(86) PCT číslo: **PCT/US2002/032904**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2003/033808**

(71) Přihlašovatel:

GMP ENDOTHERAPEUTICS, INC., Fort Lauderdale,
FL, US

(72) Původce:

Vinik Aaron I, Norfolk, VA, US
Rosenberg Lawrence, Montreal, CA
Pittenger Gary, Virginia Beach, CA, US
Taylor-Fishwick David, Norfolk, VA, US
Salem Michael, Ft. Lauderdale, FL, US
Mohrhand Scott, Plantation, FL, US

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1273/1, Praha
4, 14021

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Farmaceutický prostředek, jeho použití a
systava ho obsahující**

(57) Anotace:

Předložené řešení se týká farmaceutického prostředku
obsahujícího INGAP peptid, jeho použití a systava, která tento
farmaceutický prostředek obsahuje. Je popsáno také jeho
dávkování. Prostředek je schopen regenerovat funkční
Langerhansovy ostrůvky.

CZ 2004 - 479 A3

Farmaceutický prostředek, jeho použití a sestava ho obsahující

Oblast techniky

Předložený vynález se týká farmaceutického prostředku, jeho použití a sestavy, která ho obsahuje.

Dosavadní stav techniky

Hmotnost buněk pankreatických ostrůvků se u diabetes mellitus typu I, onemocnění, u něhož progresivní autoimunitní reakce vede k selektivní destrukci β -buněk produkujících inzulin, ztrácí. U diabetes mellitus typu II, tak zvaném onemocnění s nástupem u dospělých, ale také zvyšujícím se u mladých lidí s nadváhou, může být hmotnost β -buněk snížena až na 60 % normální hladiny. Počet fungujících β -buněk v pankreasu má rozhodující význam pro vývoj, průběh a nástup diabetu. U diabetu typu I dochází ke snížení hmotnosti β -buněk na méně než 2 % z normálu. I při intenzivní rezistenci na inzulin, jak k tomu dochází u diabetu typu II, dochází k vývoji diabetu pouze tehdy, jestliže existuje nepřiměřené kompenzační zvýšení hmotnosti β -buněk. Vývoj kterékoli z hlavních forem diabetu může být tedy považován za selhání adaptivního růstu β -buněk a následující nedostatečnosti sekrece inzulinu. Schopnost stimulovat růst ostrůvků a β -buněk z prekurzorových buněk, známa jako neogenese ostrůvků, by byla novým a přitažlivým přístupem pro zlepšení diabetu.

V serii pokusů byl připraven pankreatický extrakt, nazvaný ilotropin. Bylo ukázáno, že stimuluje neogenesi β -buněk z před tím existujících buněk souvisejících s systémem pankreatického vývodu. Na základě hypotézy, že transformace buněk pankreatického vývodu vedoucí k neogenesi ostrůvků je závislá na endogenních růstových faktorech, genech a proteinových produktech, byl proveden výzkum identifikace aktivní složky v ilotropinu. Tato linie výzkumu vedla k objevu nového genu a s ním souvisejícího proteinu, proteinu souvisejícího s neogenesí ostrůvků (INGAP).

Bylo ukázáno, že INGAP peptid (INGAP¹⁰⁴⁻¹¹⁸), sekvence 15 aminokyselin obsažená v INGAP o 175 aminokyselinách, stimuluje proliferaci buněk vývodu u křečků. INGAP peptid jsou aminokyseliny 103 až 117 sekvence id. č. 2 z USA patentu č. 5 834 590, který je zde zahrnut jako odkaz.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká režimů dávkování a přípravků s INGAP peptidem. Je ukázáno, že zde popsany přípravek má přijatelnou stabilitu jako farmaceutické činidlo a přiměřenou bezpečnost při klinických pokusech u lidí. Dále je ukázáno, že takto připravený INGAP peptid regeneruje funkční buňky ostrůvků, které si uchovávají normální regulaci zpětné vazby.

Předmětem předloženého vynálezu je tedy získat farmaceuticky přijatelný a stabilní prostředek INGAP peptidu, který je zahrnut v neogenesi Langerhansenových ostrůvků.

Jiným předmětem tohoto vynálezu je získat způsoby léčení diabetu u savců.

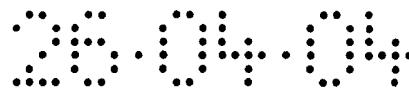
Ještě jiným předmětem vynálezu je získat způsoby léčení regulace abnormální fyziologické glukosy u savců.

Ještě jiným předmětem tohoto vynálezu je získat způsoby zvýšení počtu pankreatických beta buněk nebo Langerhansových ostrůvků u savců.

Ještě jiným předmětem vynálezu je získat způsob léčení savců tím, že savci dostanou transplanty buněk ostrůvků.

Ještě jiným předmětem vynálezu je získat způsob léčení indukováním diferenciace předků pankreatických buněk.

Všechny zde uvedené dokumenty jsou zde zahrnuty odpovídající částí jako odkaz. Citaci jakéhokoliv dokumentu nelze vyložit jako přijetí, že jde o předchozí oblast techniky vzhledem k předloženému vynálezu.



V následující části popisu budou stručně popsány grafy a obrázky.

Obrázek 1 ukazuje ARIP buňky (buněčná linie krysího pankreatického vývodu), ošetřené INGAP peptidem, ukazující zvýšení počtu buněk závisící na dávce.

Obrázek 2 ukazuje zvýšení hmotnosti buněk ostrůvků po podání INGAP normálním syrským křečkům.

Obrázek 3 ukazuje časový průběh glukosy v krvi po podání INGAP peptidu nebo solného roztoku diabetickým myším C57BL/6J, jejichž diabetes byl indukován streptozotocinem.

Obrázek 4 ukazuje normální distribuci inzulínu a glukagonu ve slinivce břišní diabetických myší C57BL/6J, jejichž diabetes byl indukován streptozotocinem, které byly léčeny INGAP peptidem.

Obrázek 5 ukazuje, že INGAP peptid stimuluje expresi PDX-1 v buňkách stěny pankreatického vývodu myší C57BL/6J.

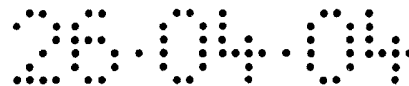
Obrázek 6 ukazuje histologické srovnání slinivky břišní odebrané myším C57BL/6J ošetřených streptozotocinem a streptozotocinem s následným léčením INGAP.

Obrázek 7 ukazuje zvýšení % plochy tkáně imunoreaktivní na inzulín u normálních myší léčených INGAP peptidem po dobu 31 dne.

Obrázek 8 ukazuje zvýšení % plochy tkáně imunoreaktivní na inzulín u normálních psů léčených INGAP peptidem po dobu 34 dnů.

V další části je uveden podrobný popis vynálezu. Nejdříve bude uveden seznam definicí pojmů, které jsou zde používány.

„Farmakologicky přijatelná sůl“ znamená kationtovou sůl vytvořenou na jakékoliv kyselé (např. karboxylové) skupině nebo jakoukoliv aniontovou sůl vytvořenou



na jakékoliv bazické (např. aminové, alkylaminové, dialkylaminové, morfolinové a podobné) skupině sloučenin podle vynálezu. Jelikož IGAP peptid je obojetný, je možná a přijatelná jakákoliv sůl. Mnohé takové soli jsou známy v oblasti techniky. Mezi výhodné kationtové soli patří, ale bez omezení na ně, soli alkalických kovů (jako jsou sodné a draselné), soli kovů alkalických zemin (jako jsou hořčík a vápník) a organické soli, jako jsou amonné soli. Mezi výhodné aniontové soli patří halogenidy, sulfonáty, karboxyláty, fosfáty a podobné. Jasně uvažovanými mezi těmito solemi jsou adiční soli, které mohou poskytovat optické centrum, kde před tím žádné nebylo. Například ze sloučenin podle předloženého vynálezu se může připravit chirální sůl vínanu. Tato definice zahrnuje takové chirální soli. Uvažované soli jsou netoxické v množstvích podávaných pacientovi – živočichovi, savci nebo člověku. Mezi příklady příslušných adičních solí s kyselinou patří, ale bez omezení na ně, chlorid, bromid, jodid, síran, hydrogensíran, acetát, trifluoracetát, dusičnan, citrát, fumarát, mravenčan, stearát, sukcinát, maleinát, malonát, adipát, glutarát, laktát, propionát, butyrát, vínan, methansulfonát, trifluormethansulfonát, p-toluensulfonát, dodecylsulfát, cyklohexansulfamát a podobné,

„Biologicky hydrolyzovatelné estery“ jsou estery sloučenin podle vynálezu, u nichž ester v podstatě neinterferuje, s výhodou neinterferuje, s biologickou aktivitou sloučeniny, nebo u nichž se ester snadno převádí v hostiteli tak, že poskytuje účinnou sloučeninu. V oblasti techniky je známo mnoho takových esterů, jak je popsáno v USA patentu č. 4 783 443, Johnston a Mobashery, 8. listopadu 1988. Mezi takové estery patří nižší alkylestery, nižší acyloxyalkylestery (jako jsou acetoxymethyl, acetoxyethyl, aminokarbonyloxymethyl, pivaloyloxymethyl a pivaloyloxyethylestery), laktonylestery (jako jsou ftalidyl a thioftalidylestery), nižší alkoxyacyloxyalkylestery (jako jsou methoxykarbonyloxymethyl, ethoxykarbonyloxyethyl a isopropoxykarbonyloxyethylestery), alkoxyalkylestery, cholinové estery a alkylacylaminoalkylestery (jako jsou acetamidomethylestery).

Pojem „léčení“ se zde používá tak, že znamená, alespoň podání sloučeniny podle předloženého vynálezu pro zmírnění onemocnění souvisejícího s regulací abnormální fyziologické glukosy u subjektu, s výhodou u savčího subjektu, výhodněji u člověka. Pojem „léčení“ tedy zahrnuje: prevenci poruch způsobených regulací abnormální fyziologické glukosy u subjektu, zvláště tehdy, když subjekt má dispozi

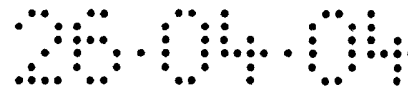
k získání tohoto onemocnění, ale ještě toto onemocnění nebylo diagnostikováno, inhibování poruchy způsobené abnormální regulací fyziologické glukosy a/nebo zmírnění nebo zastavení poruchy způsobené abnormální regulací fyziologické glukosy. Pokud jde o způsoby podle předloženého vynálezu, které se týkají předcházení poruchy způsobené abnormální regulací fyziologické glukosy, je tomu třeba rozumět tak, že pojem „předcházet“ nevyžaduje, aby stav onemocnění byl úplně zlikvidován (viz Webster's ninth collegiate dictionary). Spíše, jak je zde používán, pojem předcházení označuje schopnost zručného odborníka identifikovat populaci, která je vnímavá na poruchy vyvolané abnormální regulací fyziologické glukosy, tak, že k podání sloučenin podle přeloženého vynálezu může docházet před nástupem poruchy způsobené abnormální regulací fyziologické glukosy. Tento pojem neznamená to, že stavu onemocnění se lze úplně vyhnout. Populace, u které existuje riziko poruchy vyvolané abnormální regulací fyziologické glukosy (např. diabetes typu I a typu II), je taková populace, která má genetickou predispozici k diabetu, jak na to ukazuje historie onemocnění v rodině. Mezi další rizikové faktory patří obezita a dieta.

Výroba a stabilita: INGAP peptid je sekvence 15 aminokyselin sestávající z aminokyselin číslo 104 až 118 obsažených v přírodním INGAP sestávajícím ze 175 aminokyselin. INGAP peptid může být syntetizován jakýmkoliv rozmanitými způsoby známými v oblasti techniky, i když výhodnými způsoby syntézy jsou 9-fluorenyl-methoxykarbonylové (Fmoc) syntézy v pevné fázi. Výhodnou formou INGAP peptidu je INGAP peptid ve formě farmaceuticky přijatelné soli, s výhodou acetátu. Tvorba solí peptidů je v oblasti techniky známa. Fmoc syntéza je popsána v USA patentu č. 4 108 846. Fmoc používá piperidiny pro štěpení methoxykarbonylové skupiny (moc) a trifluoroctové kyseliny (TFA) pro odštěpení peptidu z pryskyřice. INGAP vyrobený podle tohoto způsobu se může snadno vyčistit preparativní HPLC chromatografií.

INGAP peptid má následující sekvenci aminokyselin:

$\text{NH}_2\text{-Ile-Gly-Leu-His-Asp-Pro-Ser-His-Gly-Thr-Leu-Pro-Asn-Gly-Ser-COOH}$

(sekv. id. č. 3).

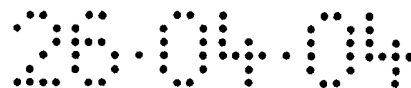


INGAP peptid má chemický vzorec $C_{64}H_{100}N_{20}O_{22}$, molekulovou hmotnost $1501,6 \pm 1$ a specifickou rotaci $-103,2^\circ$ v 1% kyselině octové.

Struktura INGAP peptidu je potvrzena aminokyselinovou analýzou, při které se molekula INGAP peptid hydrolyzuje na aminokyseliny, ze kterých sestává. Množství aminokyselin se kvantitativně vyhodnotí. Ukazuje se, že jsou přítomny v přesném molárním poměru ve vztahu k molekulové struktuře. Molekulová hmotnost tohoto peptidu se může stanovit použitím hmotnostní spektrometrie elektrosprejem a měla by být s souhlasu s vypočtenou, teoretickou hmotností molekuly ($1501,6 \pm 1$ hmotnostní jednotka).

Pro potvrzení toho, že syntetická molekula je biologicky aktivní, se může použít biotest pro potvrzení této aktivity. V tomto testu se používají buňky ARIP, buněčná linie kryšího pankreatického vývodu, získané z ATCC (Manassas, Va.). Buňky se kultivují na kultivační desce o 96 jamkách v množství 10 000 buněk na jamku. Kultivace probíhá 24 hodiny v mediu DMEM (Dulbeccovo minimální esenciální medium), které obsahuje 10 % hmotn. plodového hovězího sera. Po 24 hodinách se toto medium nahradí médiem DMEM bez sera. Duplikátní jamky byly ošetřeny různými dávkami (0 , 10^{-3} a 10^{-5} g/ml) INGAP peptidu. Po 21 hodině se medium doplní o bromdeoxyuridinový (BrdU) labelující roztok z ELISA sestavy pro proliferaci BrdU buněk (Roche Molecular Biochemicals) a kultivuje se další 3 hodiny. Po 24 hodinách se buňky suší 60 minut při 60°C , fixují se a denaturují. Vystaví se působení BrdU protilátky po dobu 90 minut a vyvíjejí se 15 minut, vše podle pokynů v sestavě. BrdU značení se kvantitativně vyhodnotí na zařízení Wallac Victor 1420 Multilabel Counter. Výsledky se srovnávají se standardní křivkou růstu buněk na stejné kultivační desce, vyseté v hustotách od 100 do 20 000 buněk na jamku. Jak je ukázáno na obrázku 1, jestliže se používá tento test, dochází k přibližně 1,6-násobnému zvýšení počtu buněk při srovnání s kontrolami v kulturách ošetřených $0,1 \mu\text{g/ml}$ INGAP peptidu.

Stabilita INGAP peptidu: Stabilita se stanoví srovnáváním různých parametrů, mezi které patří, ale bez omezení na ně, stupeň čistoty, celková procenta nečistoty, procento jednotlivých nečistot (jak se stanoví HPLC nebo jiným vhodným kvantitativním způsobem), vzhled a obsahy vody ve vzorku. Pro stanovení jakéhokoliv



zvýšení hladin degradačních produktů vzhledem k hladině INGAP peptidu se může použít HPLC. Vzorky INGAP peptidu (jak roztok tak lyofilizovaný prášek) se skladují za různých teplot, v přítomnosti nebo nepřítomnosti vlhkosti, ve světlých nebo tmavých ampulkách. Degradace během různých podmínek skladování vede ke zvýšení nečistot a k poklesu obsahu INGAP peptidu. Je žádoucí, aby připravený vzorek byl čistší než z 80 %, s výhodou čistší než 90 %, výhodněji čistší než 95 % a nejvýhodněji čistší než 97 %.

INGAP peptid jako lyofilizovaný prášek je stabilní za různých podmínek skladování. Čistota INGAP peptidu se za těchto podmínek uchovává a degradačních produktů je méně než jsou přijatelné hodnoty. Další skladování až po dobu šesti měsíců nezpůsobuje žádnou pozorovatelnou degradaci INGAP peptidu.

Prostředky: Dalším aspektem tohoto vynálezu jsou prostředky, které obsahují: a) bezpečné a účinné množství peptidu podle předloženého vynálezu a b) farmaceuticky přijatelný nosič. Používají se standardní farmaceutické přípravky, jako jsou ty, které jsou popsány v *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pa., poslední vydání.

„Bezpečné a efektivní množství“ znamená takové množství peptidu podle vynálezu, které je dostatečné pro významné indukování pozitivní modifikace stavu, který má být léčen, ale dostatečně nízké pro to, aby se obešly vážné vedlejší účinky (jako je toxicita, podráždění nebo alergická odpověď) u živočicha, s výhodou u savce, výhodněji u člověka, který to potřebuje, přiměřeně s odůvodnitelným poměrem příznivý účinek/riziko, jestliže se používá způsobem podle vynálezu. Toto specifické „bezpečné a účinné množství“ bude zřejmě rozdílné podle takových faktorů, jako jsou příslušný stav, který má být léčen, fyzický stav subjektu, doba trvání léčení, povaha současné terapie (pokud nějaká existuje), specifická dávková forma, která se používá, použitý nosič, rozpustnost peptidu v tomto nosiči a dávkovací režim, který je pro prostředek vyžadován. Zručný odborník z oblasti techniky může použít následující citace pro stanovení „bezpečného a efektivního množství“ v souladu s předloženým vynálezem: Spilker B.: *Guide to Clinical Studies and Developing Protocols*, Raven Press Books, Ltd., New York, 1984, str. 7 až 13 a 54 až 60, Spilker B.: *Guide to Clinical Trials*, Raven Press, Ltd., New York, 1991, str. 93 až 101, Craig C a Stitzel

R., red., *Modern Pharmacology*, druhé vydání, Little, Brown and Co., Boston, 1986, str. 127 až 133, T. Speight, red., *Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, třetí vydání, Williams and Wilkins, Baltimore, 1987, str. 50 až 56, a R. Talladria, R. Raffa a P. McGonigle: *Principles in General Pharmacology*, Srpinge-Verlag, New York, 1988, str. 18 až 20.

Peptid podle vynálezu se rozpustí nebo se suspenduje ve farmaceuticky přijatelném pufru. Puf, ve kterém je peptid rozpuštěn, může ovlivňovat pH, rozpustnost a tedy biologickou dostupnost peptidu. Výběr pufru závisí na složení peptidu, na způsobu podávání a na rozsahu rozpustnosti, která je pro peptid vyžadována, na životnosti peptidu ve fyziologickém stavu a na pH a pufrovací schopnosti fyziologické kapaliny. Hodnota pH vhodného pufru může být blízko hodnoty pK_a peptidu nebo může záviset na fyziologickém stavu systému, kam se má peptid dodávat. Mezi vhodné pufrы patří, ale bez omezení na ně, fosfát, acetát, uhličitan, hydrogenuhličitan, glycin, citrát, imidizol a další. Zvláště výhodným pufrém je acetátový pufr.

Vedle předmětného peptidu prostředky podle předloženého vynálezu obsahují farmaceuticky přijatelný nosič. Pojem „farmaceuticky přijatelný nosič“, jak je zde používán, znamená jedno nebo více slučitelných pevných nebo kapalných plnidel, ředidel nebo látek uzavírajících prostředek do tobolky, které jsou vhodné pro podávání živočichovi, s výhodou savci, výhodněji člověku. Pojem slučitelný“, jak se zde používá, znamená, že složky prostředku jsou schopny smíchat se s předmětným peptidem a navzájem mezi sebou, takovým způsobem, že nedochází k žádné interakci, která by podstatně snížila farmaceutickou účinnost prostředku za podmínek obvyklého používání. Farmaceuticky přijatelné nosiče musí mít ovšem dostatečně vysokou čistotou a dostatečně nízkou toxicitu, aby byly vhodné pro podávání živočichovi, s výhodou svaci, výhodněji člověku, který má být léčen. Výběr farmaceuticky přijatelného nosiče, který se má používat s předmětnou sloučeninou, je v zásadě dán způsobem, kterým se má peptid podávat. Jestliže se předmětný peptid podává injekčně, výhodný farmaceuticky přijatelný nosič se připravuje sterilní, s koloidním suspenzačním činidlem slučitelným s krví.

Mezi farmaceuticky přijatelné nosiče pro systémové podávání zvláště patří cukry, škroby, celulósa a její deriváty, slad, želatina, talek, síran vápenatý, rostlinné

oleje, syntetické oleje, polyoly, kyselina alginová, roztoky fosforečnanového pufru, emulgační činidla, isotonický solný roztok a apyrogenní voda. Mezi výhodné nosiče pro parenterální podávání patří propylenlglykol, ethyl-oleát, pyrrolidon, ethanol a sezamový olej. Farmaceuticky přijatelný nosič je v prostředcích pro parenterální podávání s výhodou obsažen v množství alespoň 90 % hmotn. z celkové hmotnosti prostředku.

Prostředky podle předloženého vynálezu se s výhodou připravují v jednotkové dávkové formě. Pojem „jednotková dávková forma“, jak se zde používá, znamená prostředek podle tohoto vynálezu, který obsahuje takové množství INGAP peptidu, které je vhodné pro podávání živočichovi, s výhodou svaci, výhodněji člověku, v jediné dávce souladu s dobrou lékařskou praxí. Tyto prostředky s výhodou obsahují od 0,1 mg do 300 mg, výhodněji od 5 mg do 150 mg, INGAP peptidu. Frekvence léčení prostředkem podle tohoto vynálezu může být změněna tak, aby se dosáhlo žádané jednorázově podané dávky a rovněž tak, aby nedošlo k vedlejším účinkům. Mezi neomezující příklady časového schéma podávání patří denně, dvakrát denně, třikrát denně, týdně, jednou za dva týdny, měsíčně a jejich kombinace. Prostředek podle vynálezu se může podávat také jako kontinuální infuze.

Prostředek podle tohoto vynálezu může existovat v jakékoliv formě, která je vhodná, například pro orální, místní, nosní nebo parenterální podávání. Podle příslušného způsobu podávání se mohou používat rozmanité žádané farmaceuticky přijatelné nosiče dobře známé v oblasti techniky. Mezi ně patří kapalná nebo pevná plnidla, ředidla, hydrotropní činidla, povrchově aktivní činidla a látky po zahrnutí prostředku do tobolek. Mezi případné farmaceuticky aktivní materiály patří ty, které podstatně neinterferují s aktivitou INGAP peptidu, Množství nosiče používaného u INGAP peptidu je dostatečné pro to, aby poskytlo praktické množství materiálu pro podávání jednotkové dávky INGAP peptidu. Způsoby a prostředky pro výrobu dávkových forem užitečných ve způsobech podle tohoto vynálezu jsou popsány v následujících odkazech: *Modern Pharmaceutics*, kapitoly 9 a 10 (Banker & Rhodies, red., 1979), Lieberman a spol.: *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* (1981), a Anlse: *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, druhé vydání (1976).

Přípravek s INGAP peptidem: Výhodným přípravkem s INGAP peptidem je roztok pro injekce používající sterilní vodu a chlorid sodný, ten podle potřeby pro úpravu tonicity roztoku, ve čtyřech různých koncentracích: 0, 7,5, 30 a 120 mg/0,5 ml/ampulku. Pro úpravu hodnoty pH na výhodnou úroveň se, podle nutnosti, může použít kyselina chlorovodíková a hydroxid sodný. Další koncentrace se mohou připravovat zředěním vyšších koncentrací zásobního roztoku použitím isotonického solného roztoku. Zředění neovlivňuje biologickou aktivitu INGAP peptidu.

Takto připravený přípravek s INGAP peptidem je stabilní v rozmezí pH 4 až 6, jestliže je skladován při 5 °C a jestliže je umístěn buď v tmavé nebo světlé nádobě. Někdy se však pozoruje degradace, jestliže je prostředek skladován při 25 °C. Degradace je zřejmější u prostředku s pH 6 než u prostředku s pH 4,5. Zdá se, že INGAP peptid je stabilnější, jestliže je skladován pod 8 °C a pod pH 6.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Roztok INGAP peptidu pro injekce

Připraví se roztok 120 mg INGAP peptidu s následujícími hodnotami:

Tabulka 1

parametr	specifikace
vzhled	čirý bezbarvý roztok
test	každá ampulka obsahuje 90,0 % až 110,0 % INGAP peptidu
nečistoty	každá nečistota: 1,0 % celkem nečistoty: 3,0 %
pH	4,0 až 5,0
bakteriální endotoxiny	NMT 2,92 EU/mg
sterilita	vyhovuje normě USP

Příklad 2

Podávání INGAP peptidu normálním křečkům

Byly studovány účinky INGAP peptidu na tvorbu ostrůvků u normálních křečků. INGAP peptid (5 mg/kg; 25 mg/m²) byl podáván intraperitoneálně denně po dobu 4 týdnů. Hmotnost β -buněk byla hodnocena po 10 dnech a po 30 dnech. Léčení INGAP peptidem vedlo k významnému zvýšení počtu ostrůvků při srovnání se živouchy, kterým bylo podáváno placebo, obrázek 2. Účinek neogenese ostrůvků byl ukázán na produkci většího množství inzulinu a na zvýšení počtu ostrůvků ve slinivce břišní. Nově vytvořené β -buňky se objevily ve stěně a vycházely z vývodu pankreasu. Tyto na inzulin pozitivní buňky pocházely z diferenciacie epitelních buněk vývodu a z růstu buněk ostrůvků. Jejich objevení se bylo úměrné dávce a době trvání léčení INGAP peptidem. Po delších dobách léčení tyto buňky migrovaly z vývodu a vytvořily ostrůvky v parenchymu slinivky břišní. Po 10 po sobě následujících dnech podávání INGAP peptidu došlo k 30% zvýšení počtu ostrůvků a po 30 dnech ke zdvojnásobení počtu ostrůvků ve tkáních, což je v souladu s předchozími pozorováními u zvířecích modelů používajících ilotropin, rINGAP a zabalení do celofánu.

Příklad 3

Studie účinnosti in vivo

Myši C57BL/6J byly převedeny na diabetické působením STZ (35 mg/kg/den x 5 dnů). Byly rozděleny na skupinu léčenou INGAP peptidem (dvakrát denně 250 μ g) a kontrolní skupinu, které byl podáván solný roztok. Obě skupiny obsahovaly 4 myši. Všechna čtyři zvířata léčená INGAP peptidem měla koncentraci glukosy v krvi restaurovanou na normální hodnotu, zatímco všechny myši léčené solným roztokem zůstaly hyperglykemické (obrázek 3). Po 39 dnech se dávkování zastavilo. Další pozorování ukázala na trvanlivost účinku po dobu 48 dnů, kdy studie skončila. Histopatologické vyhodnocení živouchů léčených INGAP peptidem ukázalo jak přítomnost normálně se objevujících ostrůvků tak oblastí tvorby nových ostrůvků, zahrnujících doplnění a distribuci buněk sekretujících inzulin a glukagon (obrázek 4 a 6). Objevení se buněk

produkujících glukagon je cenné, jelikož glukagon hraje hlavní roli v obraně proti hypoglykemii. Tato vlastnost INGAP peptidu indukovat neogenesi ostrůvků by mohla pomoci obrátit porušenou protiregulační kontrolu hypoglykemie související s nadměrným léčením diabetu. Hypoglykemie nebyla pozorována u žádného zvířete léčeného INGAP peptidem. U kontrolních živočichů léčených solným roztokem nebyl pozorován vznik žádných nových ostrůvků. Podávání INGAP peptidu indukovalo transdiferenciaci buněk vývodu, jak je zřejmé z buněk exprimujících transkripční faktor PDX-1 (obrázek 5). Ostrůvky u STZ-diabetických zvířat léčených solným roztokem vykazovaly těžký protizánětlivý infiltrát a byly nekrotické. U zvířat léčených INGAP peptidem byl zánět znatelně snížen a ostrůvky se zdály být zdravé (obrázek 6).

Obrázek 4 ukazuje imunocytochemické vlastnosti slinivky břišní u myší C57BL/6J ošetřených streptozotocinem a dále léčených INGAP peptidem. Horní levý panel ukazuje ostrůvek stále ještě asociovaný se segmentem epitelu vývodu obarveným protiinzulinovou protilátkou, což ukazuje normální přítomnost a distribuci inzulínového proteinu. Dolní levý panel ukazuje stejný ostrůvek obarvený směsí anti-glukagonových a anti-somatostatinových protilátek, což také ukazuje na normální distribuci těchto proteinů buněk ostrůvků v oblasti pláště ostrůvků. Horní pravý panel ukazuje nově vytvořené pupeny ostrůvků vývodu zbarvené barvivem H & E. Dolní pravý panel ukazuje buňky pozitivní na inzulín ve stěně vývodu.

Příklad 4

Studie myší po dobu 31 dnů (opakované dávkování)

Toxikologická studie v závislosti na opakované dávce byla provedena u myší při 31 dnech denního podávání injekce INGAP peptidu v dávce 0, 2, 20 a 100 mg/kg/den. V této studii byly použity čtyři skupiny podrobující se léčení, v nichž bylo 10 samců a 10 samic, a dvě kontrolní skupiny o 5 samcích a 5 samicích. Krev byla odebrána na konci pokusu. Pro celková a mikroskopická pozorování byly provedeny pitvy. Klinická patologie a hladiny v seru byly vyhodnoceny u přibližně poloviny zvířat v každé skupině. Vybrané orgány (mozek, nadledvinky, srdce, ledviny, játra, plíce, slinivka břišní a slezina) byly odváženy a byly vypočteny relativní hmotnosti těchto orgánů. Část slinivky břišní byla odstraněna a zmrazena v kapalném dusíku pro

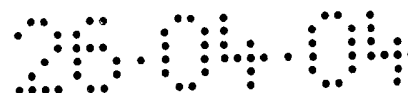
vyhodnocení obsahu inzulinu. Část tkáně slinivky břišní byla podrobena nezávislému mikroskopickému vyšetření. Kontrolní zvířata byla usmrcena 28 dnů po ukončení podávání dávek. Pro další studii byly hodnoceny různé parametry stejně jako abnormální nálezy potenciálně související s léčivem. Byla stanovena reprodukovatelnost a potenciální klinická významnost.

Podávání INGAP peptidu intramuskulární injekcí po dobu 31 po sobě následujících dnů neposkytlo žádné nepříznivé účinky související s dávkováním, jestliže byly vyhodnoceny po zastavení dávkování a během 28 dnů po léčení. U samců i samic bylo pozorováno podráždění místa injekce ve zvýšené frekvenci u nejvyšší dávky, ale nebylo pozorováno i kontrolních zvířat ve stejné dávce, což ukazovalo reverzibilitu tohoto podráždění. U jednoho samce při vysoké dávce byla v této studii pozorována ve slezině extramedulární hematopoéza. Žádný mikroskopický průkaz infiltrace zánětlivých buněk, edému, nekrosy nebo atrofie nebyl pozorován. Klíčovým zjištěním bylo zvýšení počtu malých ostrůvků, jak souvisejících s vývodem tak mezi acinárními buňkami. Hladina INGAP peptidu v seru dvě hodiny po podání dávky pro 31 po sobě následujících dnů byla pod mezemi kvantitativního vyhodnocení. U těchto zvířat byla pozorována farmakologická aktivita, která byla změřena zvýšením oblasti tkáně pozitivní na inzulin (obrázek 7). Výsledky ukazují na to, že neexistují žádné nepříznivé účinky při účinné hladině (NOAEL) větší než 100 mg/kg u CD-1 myši během 31 dnů dávkování.

Příklad 5

Studie u psů po dobu 34 dnů (opakované dávkování)

Toxikologická studie na opakovanou dávku byla prováděna u psů beagle po dobu 34 dnů s denní intramuskulární injekcí INGAP peptidu v dávce 0, 0,5, 1,5 a 10 mg/kg/den. Pro kvantitativní vyhodnocení hmotnosti β -buněk byla získána pankreatická tkáň ze zvířat usmrcených v den 34, na konci léčení, a ze zvířat vyléčených usmrcených 25 dnů po konci léčení. Hmotnost pankreatických β -buněk byla zvýšena po podávání INGAP peptidu (viz obrázek 8). Tyto výsledky ukazují, že intramuskulární injekce INGAP peptidu v rozmezí studovaných dávek poskytla biologicky důležitou odpověď u normálních psů beagle. Dále pak, při hloubkovém prozkoumání



pankreatické tkáně, sekce nevykázaly žádné změny, jako je edém, infiltrace zánětlivých buněk, nekróza nebo atrofie.

Příklad 6

Lidské klinické studie

Dávkování jsou často založena na výsledcích a studiích účinnosti a bezpečnosti u zvířat. Dvě dávky INGAP peptidu, 7,5 mg (0,125 mg/kg nebo 4,625 mg/m² u pacienta o hmotnosti 60 kg) a 120 mg (1,6 mg/kg nebo 74 mg/m² u pacienta o hmotnosti 60 kg), jsou příklady léčení diabetes mellitus typu I nebo typu II. Při stanovení účinnosti léčení INGAP peptidem byly hodnoceny následující parametry,

1. Snížení hladiny glukosy nalačno na 35 mg/dl, přičemž se udržuje celková dávka inzulínu.
2. Snížení dávky inzulínu o 25 % s tím, že se hladiny glukosy nalačno udržují v normálním rozmezí, jak je dáno kritérii Americké diabetické společnosti (ADA).
3. Získá se zvýšení C-peptidu nalačno na > 1 ng/ml. Získá se zvýšení C-peptidu na > 2 ng/ml jako odpověď na Sustacal[®] (Boost[®]).

Každý pacient byl náhodně vybrán tak, aby dostal jednu jedinou intramuskulární injekci INGAP peptidu. Po vyhodnocení dat účinnosti a bezpečnosti by mohly být pacientům podány další injekce INGAP peptidu, jak usoudí lékař za vhodné.

Následující tabulka shrnuje částečný seznam hodnocení, která byla získána u pacientů, kterým bylo poskytnuto léčení INGAP peptidem nebo placebem.

Tabulka 2

Časový průběh hodnocení

postup	předmět	původní stav	doba léčení den 1 až 34						doba po léčení den 35 až 63±2			
den návštěvy			1	7	14	21	28	34	42	49	56	63
vyšetření lékařem	x	x						x				x
životní znaky	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
klinické labora- torní testy	x	x		x	x	x	x	x				x
plasma PK pro INGAP peptid		x	x	x	x	x	x	x	x			

Stimulovaný C-peptid

Testy stimulovaného C-peptidu se provádějí ráno po období nočního hladovění alespoň 10 hodin. Tyto testy se provádějí pouze tehdy, jestliže glukosa nalačno je mezi 80 a 250 mg/dl. Pacienti si mohou vzít jejich léky na diabetes večer před testem, ale neměli by si je brát ráno v den testu, dokud test není ukončen. Vzorky krve pro stanovení C-peptidu se odeberou bezprostředně před polknutím přípravku Boost® a 0,5, 2 a 4 hodiny po polknutí. Boost® se podává polknutím. Pacienti jsou považováni za pacienty deficitní na inzulin, jestliže hodnota jejich C-peptidu nalačno je < 1,0 ng/ml a jejich maximální stimulovaná hodnota C-peptidu je , 2,0 ng/ml.

Výsledkem tohoto léčení bylo, že pacienti, kteří obdrželi INGAP peptid, vykazovali zlepšenou toleranci na cukr, sníženou hladinu glukosy nalačno, sníženou požadovanou dávku inzulinu, zvýšenou hladinu C-peptidu nalačno a zvýšenou hladinu C-peptidu jako odpověď na Boost®. Pacienti, kteří bylo léčení placebem, nevykazovali žádná taková zlepšení.

Pokud není jinak uvedeno, všechna množství, včetně kvantitativních množství, procent, podílů a poměrů, jsou chápána tak, že je lze upravit slovem „asi“ a tato množství nejsou míněna tak, že znamenají významná čísla.

Pokud není jinak uvedeno, slova znamenají „jeden nebo více“.

I když jsou zde ilustrována a popsána příslušná provedení podle předloženého vynálezu, mělo by být odborníkovi z oblasti techniky zřejmé, že lze provádět různé jiné změny a modifikace, aniž by se tyto odchýlily od ducha a rozsahu tohoto vynálezu. Popis je tedy myšlen tak, že v připojených nárocích jsou zahrnuty všechny tyto změny a modifikace, které jsou v rozsahu tohoto vynálezu.

Seznam sekvencí:

Sekvence identifikační číslo 1:

Met Met Leu Pro Met Thr Leu Cys Arg Met Ser Trp Met Leu Leu Ser Cys Leu Met

1

5

10

15

Phe Leu Ser Trp Val Glu Gly Glu Glu Ser Gln Lys Lys Leu Pro Ser Ser Arg Ile Thr

20

25

30

35

Cys Pro Gln Gly Ser Val Ala Tyr Gly Ser Tyr Cys Tyr Ser Leu Ile Leu Ile Pro Gln

40

45

50

55

Thr Trp Ser Asn Ala Glu Leu Ser Cys Gln Met His Phe Ser Gly His Leu Ala Phe Leu

60

65

70

75

Leu Ser Thr Gly Glu Ile Thr Phe Val Ser Ser Leu Val Lys Asn Ser Leu Thr Ala Tyr

80

85

90

95

Gln Tyr Ile Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser Gly

100

105

110

115

Trp Lys Trp Ser Ser Ser Asn Val Leu Thr Phe Tyr Asn Trp Glu Arg Asn Pro Ser Ile

120

125

130

135

Ala Ala Asp Arg Gly Tyr Cys Ala Val Leu Ser Gln Lys Ser Gly Phe Gln Lys Trp Arg

140

145

150

155

Asp Phe Asn Cys Glu Asn Glu Leu Pro Tyr Ile Cys Lys Phe Lys Val

160

165

170

175

Sekvence identifikační číslo 2:

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser Gly Trp Lys Trp Ser
1 5 10 15 20

Sekvence identifikační číslo 3:

Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser
1 5 10 15

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje polypeptid, který má alespoň patnáct po sobě následujících aminokyselin z přirozeně se vyskytujícího proteinu souvisejícího s neogenesí savčích ostrůvků, přičemž aminokyselinová sekvence znamená sekvenci identifikační číslo 1

Met Met Leu Pro Met Thr Leu Cys Arg Met Ser Trp Met Leu Leu Ser Cys Leu Met
1 5 10 15

Phe Leu Ser Trp Val Glu Gly Glu Glu Ser Gln Lys Lys Leu Pro Ser Ser Arg Ile Thr
20 25 30 35

Cys Pro Gln Gly Ser Val Ala Tyr Gly Ser Tyr Cys Tyr Ser Leu Ile Leu Ile Pro Gln
40 45 50 55

Thr Trp Ser Asn Ala Glu Leu Ser Cys Gln Met His Phe Ser Gly His Leu Ala Phe Leu
60 65 70 75

Leu Ser Thr Gly Glu Ile Thr Phe Val Ser Ser Leu Val Lys Asn Ser Leu Thr Ala Tyr
80 85 90 95

Gln Tyr Ile Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Ser His Gly Thr Leu Pro Asn Gly Ser Gly
100 105 110 115

Trp Lys Trp Ser Ser Ser Asn Val Leu Thr Phe Tyr Asn Trp Glu Arg Asn Pro Ser Ile
120 125 130 135

Ala Ala Asp Arg Gly Tyr Cys Ala Val Leu Ser Gln Lys Ser Gly Phe Gln Lys Trp Arg
140 145 150 155

Asp Phe Asn Cys Glu Asn Glu Leu Pro Tyr Ile Cys Lys Phe Lys Val
160 165 170 175

(sekv. id. č. 1),

sekvenci identifikační číslo 2

Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Ser	His	Gly	Thr	Leu	Pro	Asn	Gly	Ser	Gly	Trp	Lys	Trp	Ser
1					5					10					15				20

(sekv. id. č. 2)

nebo sekvenci identifikační číslo 3

Ile	Gly	Leu	His	Asp	Pro	Ser	His	Gly	Thr	Leu	Pro	Asn	Gly	Ser
1					5					10				15

(sekv. id. č. 3) a

jejich fragmenty, s pH od 4 do 6.

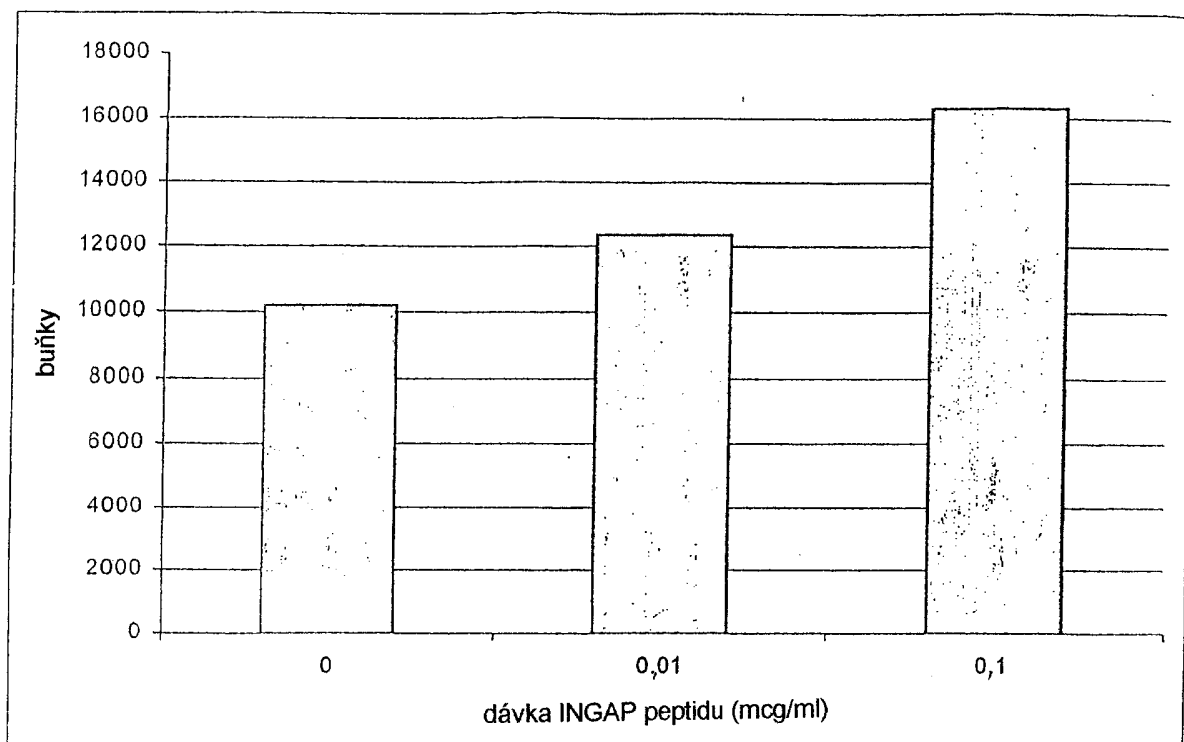
2. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, vyznačující se tím, že znamená lyofilizovaný prášek nebo roztok.
3. Farmaceutický prostředek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 2, vyznačující se tím, že má pH od 4 do 6.
4. Farmaceutický prostředek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 3, vyznačující se tím, že polypeptid je ve formě vybrané ze skupiny sestávající z farmaceuticky přijatelných esterů, solí a jejich směsí.
5. Farmaceutický prostředek podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 4, vyznačující se tím, že obsahuje od 0,1 mg do 300 mg polypeptidu.
6. Použití farmaceutického prostředku podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 5 pro výrobu léčiva pro léčení diabetu u člověka nebo u jiného živočicha.
7. Použití farmaceutického prostředku podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 6 pro výrobu léčiva pro regenerování Langerhansových ostrůvků, pankreatických beta buněk nebo pro zajištění regulace normální fyziologické glukosy u savce.

8. Použití farmaceutického prostředku podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 7, v němž podávání se provádí v takové frekvenci, která je vybrána ze skupiny sestávající z podávání denně, dvakrát denně, třikrát denně, týdně, dvakrát za týden, měsíčně, podávání kontinuální infusí a jejich kombinací.
9. Sestava pro použití podle kteréhokoliv z předcházejících nároků 1 až 8, v y - z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:
 - a) farmaceutický prostředek podle nároku 1 a
 - b) návod k použití.

28.04.04

K004-479

1/8

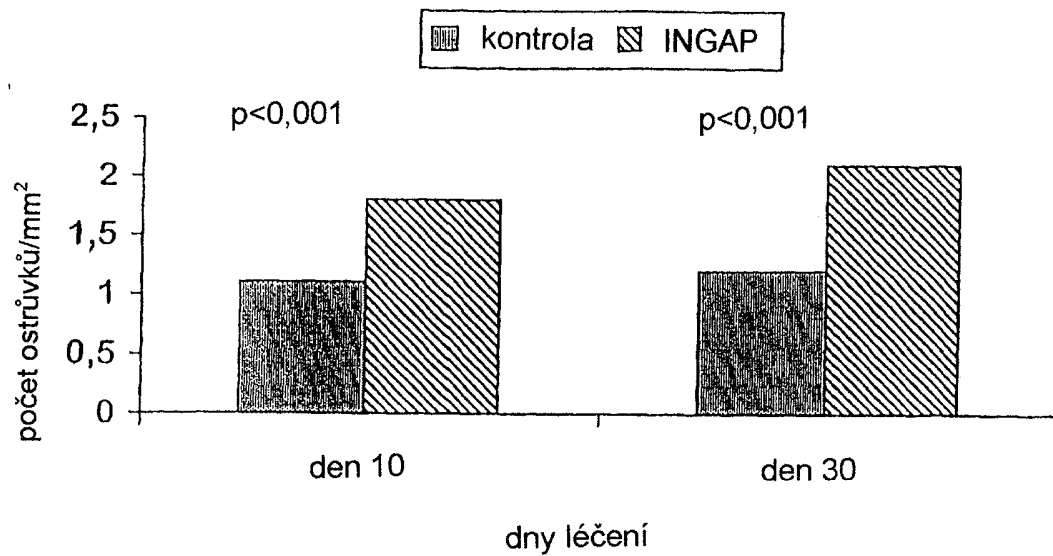
**Obrázek 1**

INGAP peptidem ošetřené buňky ARIP (krysí linie bunĳek pankreatického vývodu) ukazující zvýšení počtu bunĳek závisující na dávce.

28.04.04

2/8

2004-479

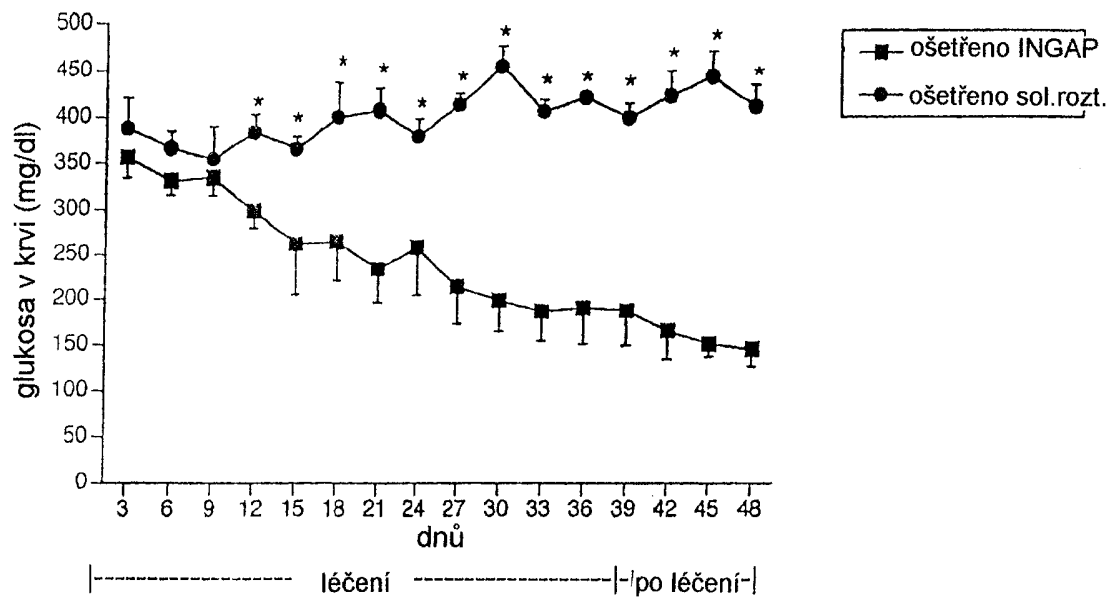
**Obrázek 2**

Zvýšení hmotnosti pankreatických endokrinních buněk po podání INGAP peptidu. Normální zlatí syří křečci byli léčeni solným roztokem (kontrola) nebo INGAP peptidem buď po dobu 10 nebo 30 dnů. Počet ostrůvků/mm² byl stanoven morfo-metrickým systémem pomocí počítače používajícího software Image-pro Plus.

28.04.04

1/8

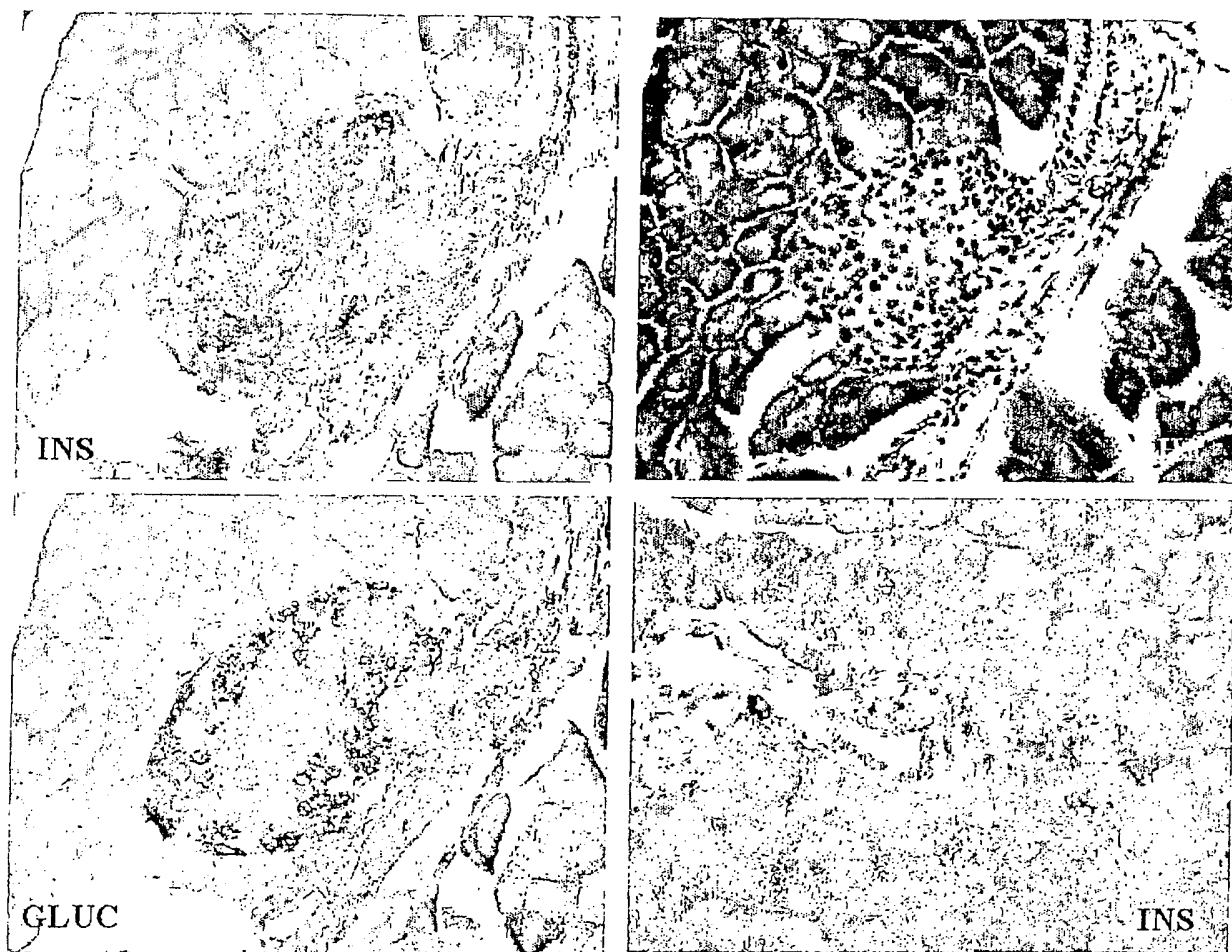
2004-479



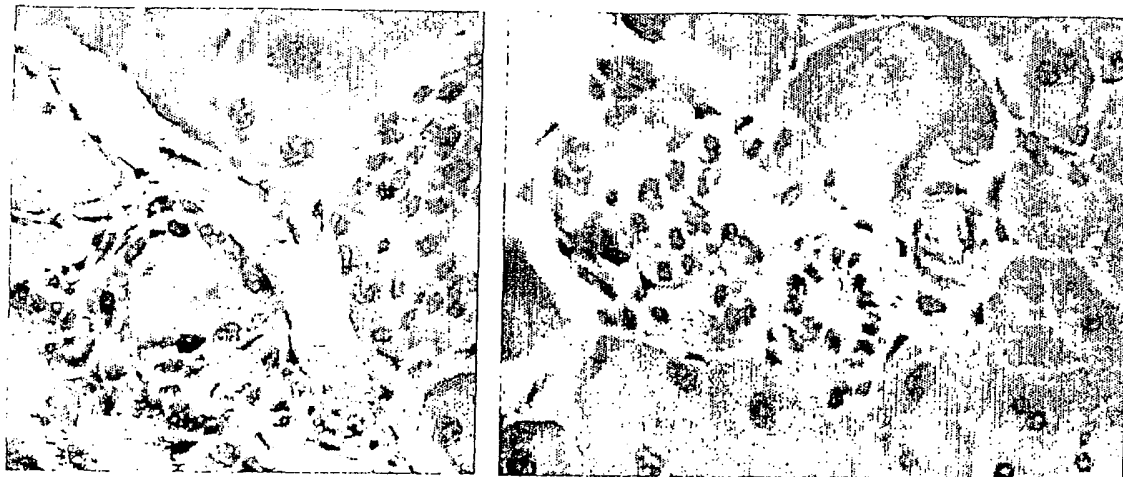
Obrázek 3

Časový průběh glukosy v krvi po podávání injekce INGAP peptidu (250 μ g/kg) dvakrát denně nebo solného roztoku po dobu 39 dnů diabetickým myším C57BL/6J, jejichž diabetes byl indukován režimem více injekcí streptozotocinu v nízkých dávkách. Hladiny glukosy v krvi byly měřeny každé tři dny. Zvířata byla ponechána dalších devět dnů po přerušení injekcí INGAP peptidu a bylo demonstrováno přetrvávání účinku léčení.

* $p < 0,025$ při srovnání se zvířaty léčenými solným roztokem

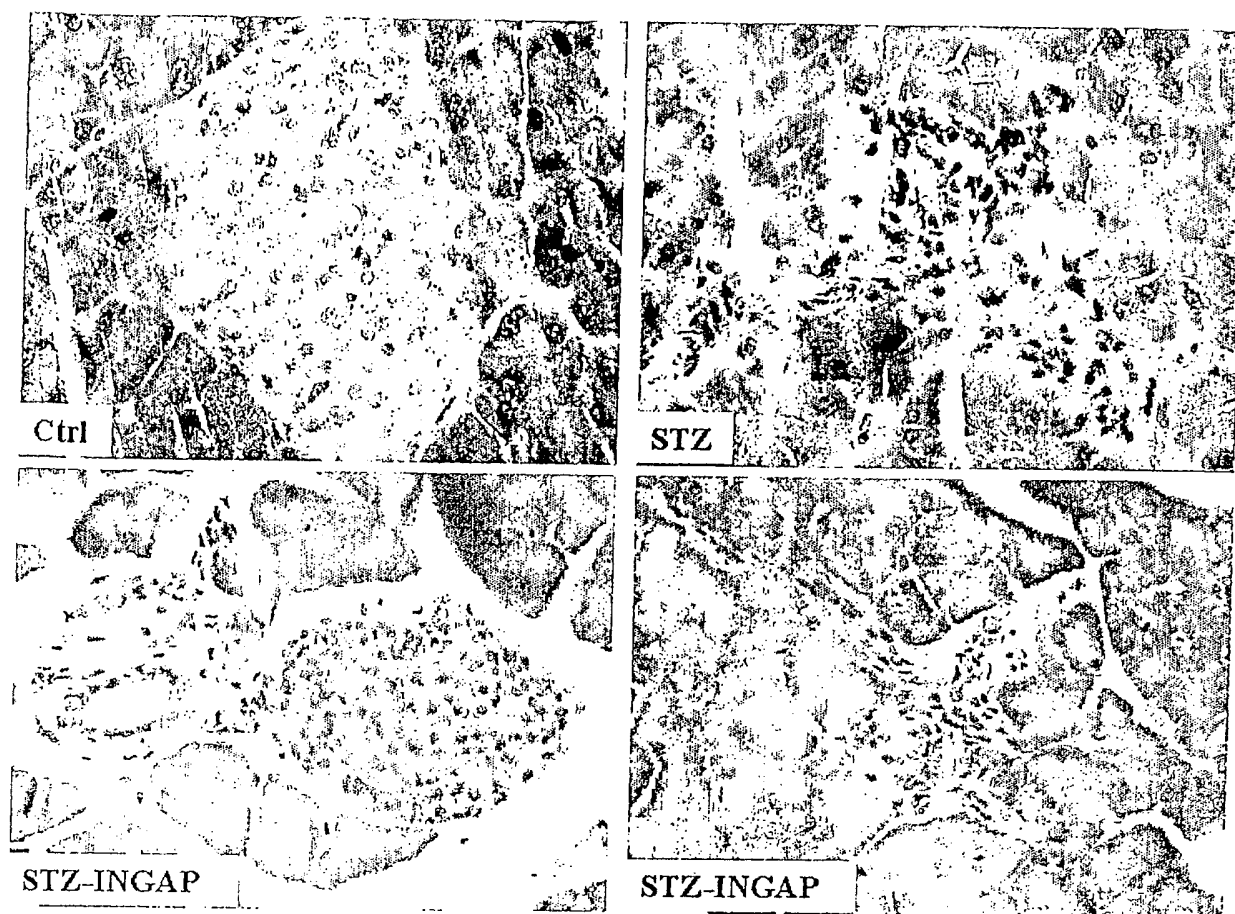
**Obrázek 4**

Immunocytochemické vlastnosti slinivky břišní diabetických myší C57BL/6J, jejichž diabetes byl indukován streptozotocinem, které byly léčeny INGAP peptidem. Horní levý panel ukazuje ostrůvek ještě asociovaný se segmentem epitelu vývodu označený anti-inzulinovou protilátkou, což ukazuje na normální přítomnost a distribuci inzulinového proteinu. Dolní levý panel ukazuje stejný ostrůvek označený směsí anti-glukagonové a anti-somatostatinové protilátky, což také ukazuje na normální distribuci proteinů buněk těchto ostrůvků v oblasti pláště ostrůvku. Horní pravý panel ukazuje nově vytvořené vypučením ostrůvků z vývodu obarvené H & N barvivem. Pravý dolní panel ukazuje buňku pozitivní na inzulin ve stěně vývodu.



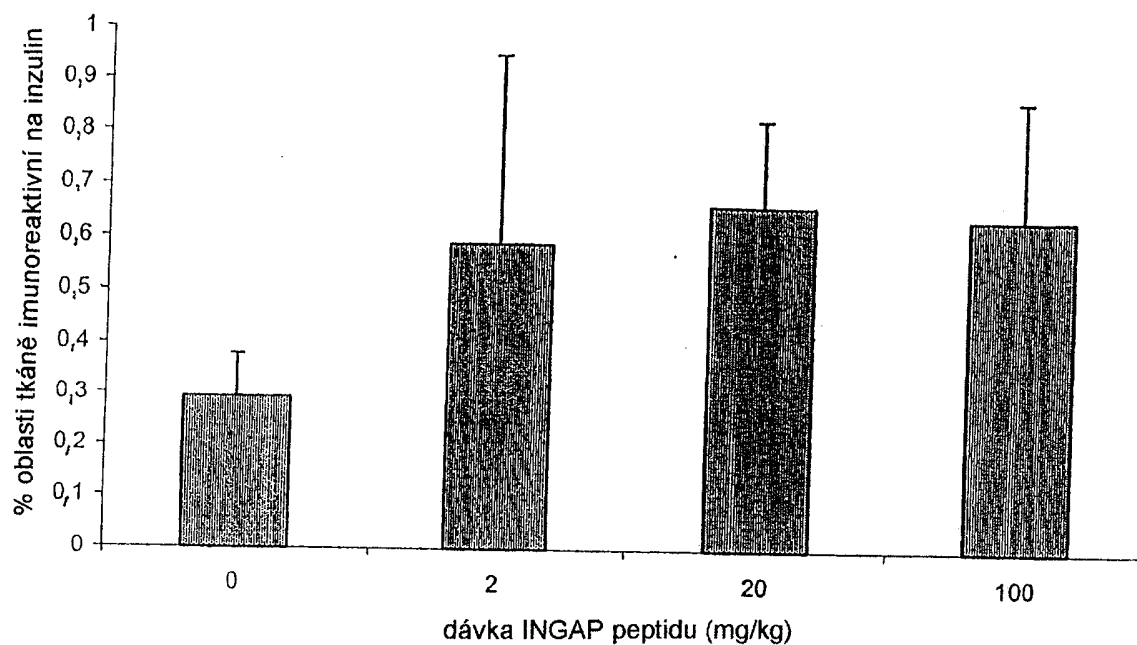
Obrázek 5

INGAP peptid stimuluje expresi PDX-1 v pankreatických vývodech myší C57BL/6J. Panel napravo je druhá oblast PDX-1 imunoreaktivity související s neogenesí buněk ostrůvků. Tmavě zbarvený materiál je PDX-1 buněk ve stěně vývodu.



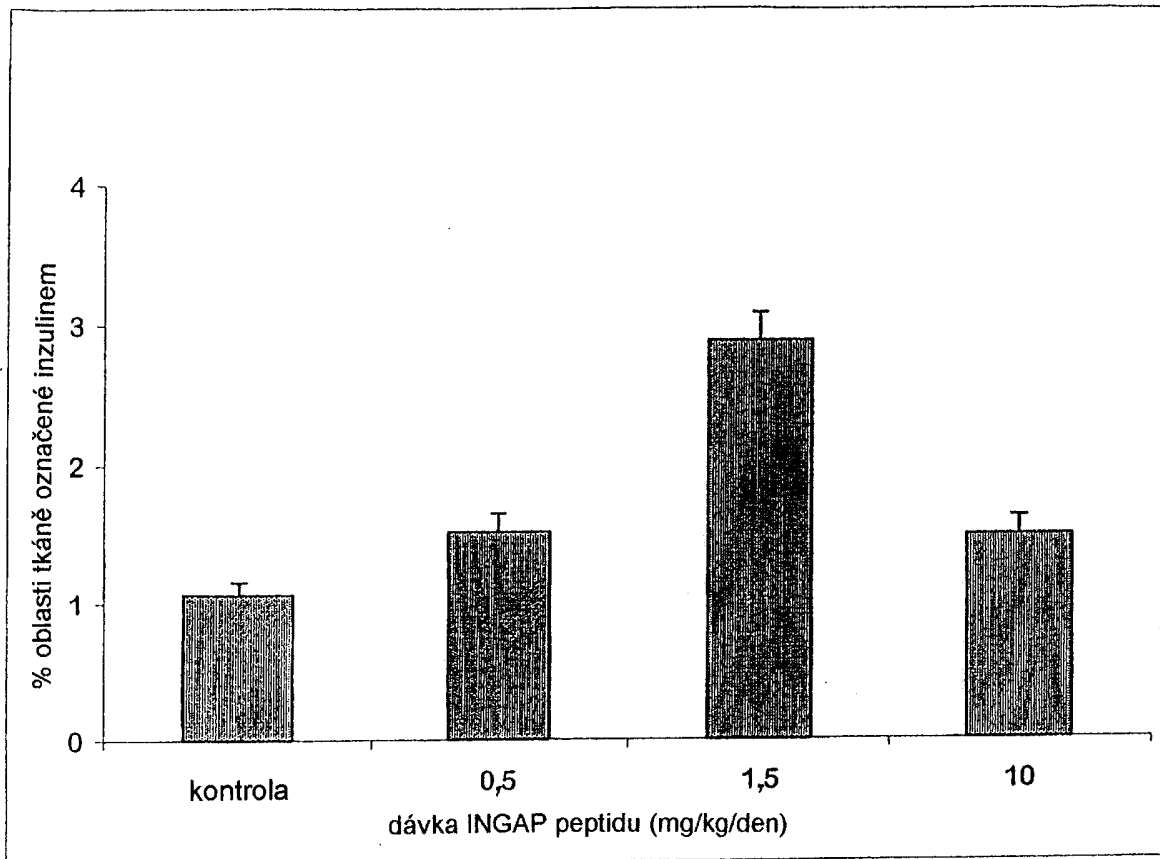
Obrázek 6

Histologické vlastnosti slinivky břišní myši C57BL/6J ošetřených streptozotocinem. Dolní pravý panel (STZ-INGAP) ukazuje slinivku břišní INGAP peptidem léčeného zvířete s oblastí neogenese buněk ostrůvků, pozorovaných jako pučení buněk z přilehlých intralobulárních chodbiček. Dolní levý panel (STZ-INGAP) je normální vzhled ostrůvku ve slinivce břišní zvířete léčeného INGAP peptidem. Horní pravý panel (STZ) ukazuje slinivku břišní zvířete léčeného solným roztokem, který ukazuje nekrotický ostrůvek se zánětlivou buněčnou infiltrační charakteristikou insulitidy, zanětu Langerhansových ostrůvků. Horní levý panel (Ctrl) ukazuje slinivku břišní kontrolní myši normálního věku, ukazující histologický vzhled normálního ostrůvku pro srovnání. Všimněte si, že INGAP restauruje histologii ostrůvku směrem k normálu.



Obrázek 7

Imunopositivní oblast tkáně u normálních myší po léčení INGAP peptidem po dobu 31 dnů. Data jsou vyjádřena jako střed $\pm$ střední odchylka. Procenta oblastí průřezu obarveného inzulinem byla stanovena mikroskopem Olympus (150 x) a softwarovou analýzou zobrazení (Image Pro Plus Version 4.0, Media Cybernetics).

**Obrázek 8**

Vlivy denní injekce INGAP peptidu u psů po dobu 34 dnů na oblast buněk ve slinivce břišní, které se stanou pozitivními na inzulin imunohistochemickým označením. Data znamenají střed $\pm$ střední odchylka. Procenta průřezu oblasti obarvené inzulinem byla stanovena mikroskopem Olympus (150 x) a softwarovou analýzou zobrazení (Image Pro Plus Version 4.0, Media Cybernetics).