DESCRIÇÃO

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 100 231

REQUERENTE: PFIZER INC., norte-americana, industrial, estabelecida em 235 East 42nd Street, New York, N.Y. 10017, Estados Unidos da América

EPÍGRAFE: "MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DO PÉPTIDO RELACIONADO COM O GENE DA CALCITONINA E AMILINA E CORRESPONDENTES ANTAGONISTAS"

INVENTORES: David Kevin Krentter

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Estados Unidos da América, em 15 de março de 1992, sob o Nº. 670 536.

Descrição referente à patente de invenção de PFIZER INC., norte-americana, industrial, estabelecida em 235 East 42nd Street, New York, N.Y. 10017, Estados Unidos da América, (inventor: David Kevin Krentter, residente nos Estados Unidos da América), para "MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DO PEPTIDO RELACIONADO COM O GENE DA CALCITONINA E AMILINA E CORRESPONDENTES ANTAGONISTAS"

D E S C R I Ç Ã O

A presente invenção refere-se à utilização do peptido relacionado com o gene da calcitonina (PRGC) ou amilina para reduzir a glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou nas células musculares. Além disso, a presente invenção descreve um método para ensaiar a capacidade de um composto para inibir a redução da glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou nas células musculares provocada pelo PRGC ou amilina. Os métodos particulares do âmbito da presente invenção emglobam os métodos para ensaiar a capacidade de um composto para inibir a redução da glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou nas células musculares provocada por amilina de origem humana ou proveniente de ratos. Por outro lado, a presente invenção refere-se a compostos capazes de inibirem a redução da glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou nas células musculares provocada pelo PRGC ou amilina. Constitui também um objectivo da presente invenção proporcionar composições farmacêuticas e métodos para inibir a redução da glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou nas células musculares num mamífero provocada pelo PRGC ou amilina.

TF



A amilina é um peptido de 37 aminoácidos com o peso molecular de 3 905 daltons e que é um produto segregado pelas células β pancreáticas. WestermarK, P., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 140:827-831 (1986); ClarK, A., et al., Lancet II:231-234 (1987); WestermarK, P. et al., Diabetologia 30:887-892 (1987); Cooper, C.J. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8628-8632 (1987); WestermarK, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3881-3885 (1987). Nos diabéticos de tipo II existem grandes depósitos de amiliódes derivados da amilina no pâncreas e foi já estabelecido como postulado que os amilóides contribuem para a patologia pancreática associada à doença. WestermarK, P., et al., Biochem Biophys. Res. Commun. 140:827-831 (1986); ClarK, a., et al., Lancet II:231-234 (1987); WestermarK, P., et al., Diabetologia 30:887-892 (1987); Cooper, C.J. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8268-8632 (1987); WestermarK, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3881-3885 (1987); WestermarK, P., et al.,AM. J. Pathol. 127:414-417 (1987); ClarK, A., et al., Diabetologia 33:285-289 (1990).

No músculo solear isolado, a amilina suprime a síntese do glicogénio estimulada pela insulina. Leighton, B., et al., Nature 335:632-635 (1988); Cooper, G.J. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7763-7766 (1988).

O efeito da amilina sobre a acção da insulina no músculo esquelético in vivo foi considerado como sendo a inibição da glicogenese a qual é o efeito principal no músculo solear isolado conforme descrito antes.

A sequência de aminoácidos para a amilina de origem humana encontra-se descrita na patente europeia EP 289 287, publicada em 2 de Novembro de 1988. A sequência de aminoácidos para a amilina do rato foi descrita por Asai, J., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 164:400-405 (1989). Os conhecimentos daí resultantes consideram-se aqui incorporados por referência.

Alguns antagonistas da amilina e correspondente utilização encontram-se descritos na patente

mundial WO89/0613 (PCT/US89/00049), publicada em 13 de Julho de 1989.

Sabe-se que o peptido relacionado com o gene da calcitonina (PRGC) ocorre pelo menos segundo duas formas (a e β) nos seres humanos, possuindo cada uma delas 37 aminoácidos. A forma β do PRGC é homóloga a 46% com a amilina. WestermarK, P., et al., Biochem. Biophys, Res. Commun. 140:827-831 (1986) and WestermarK, P., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3881-3885 (1987).

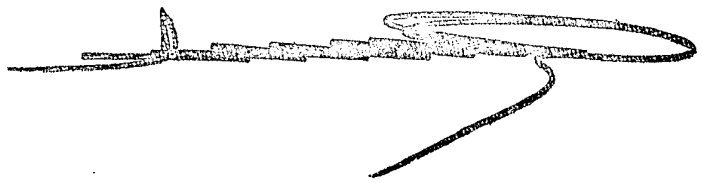
Até à data da presente invenção não se conhece nenhuma referência sobre a capacidade da amilina ou do PRGC para reduzirem a glicolise estimulada pela insulina nas células musculares.

A presente invenção refere-se à utilização de amilina ou do PRGC para reduzir a glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou nas células musculares. Conforme utilizado em toda esta memória descrita e reivindicações anexas, o termo "amilina" abrange a amilina de origem humana, a amilina proveniente de ratos e as suas correspondentes formas amidadas no terminal C. O termo "amilina" abrange também os polipeptidos que possuem praticamente a mesma sequência de aminoácidos e praticamente a mesma actividade de qualquer das referidas formas de amilina. O termo "peptido relacionado com o gene da calcitonina (PRGC)" abrange os conhecidos polipeptidos α e β e também os polipeptidos que possuem praticamente a mesma sequência de aminoácidos e praticamente a mesma actividade do polipeptidos conhecidos. Por outro lado, o termo "músculo" abrange os músculos intactos in vivo e também diversas preparações ex vivo de músculos tais como as suas correspondentes tiras. O termo "células musculares" pretende satisfazer objectivos de complementaridade e abrange todas as células musculares quer se encontrem presentes em músculos intacto in vivo, em diversas preparações musculares ex vivo ou em culturas in vivo de células musculares conhecidas de per si. A utilização da amilina ou do PRGC para reduzir a glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou nas células musculares possui uma utilidade praticamente benéfica na pes-

quisa de compostos que inibam a capacidade da amilina ou do PRGC para reduzir a glicolise estimulada pela insulina e consequentemente são benéficos para o tratamento de diabetes de tipo II (NIDDM).

A presente invenção descreve também um método para ensaiar a capacidade de um composto para inibir a redução da glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou nas células musculares provocada pela amilina ou PRGC. Esse método consiste em fazer a incubação do músculo ou das células musculares em presença de insulina, amilina ou PRGC, um composto e glicose radioidentificada; depois mede-se a quantidade do produto de glicolise radioidentificado do músculo ou das células musculares assim incubadas; e a seguir procede-se à comparação da quantidade que se mediu com a quantidade medida de produto de glicolise radioidentidicado quando o músculo ou as células musculares são incubados em presença de insulina, amilina ou PRGC e glicose radioidentidicada.

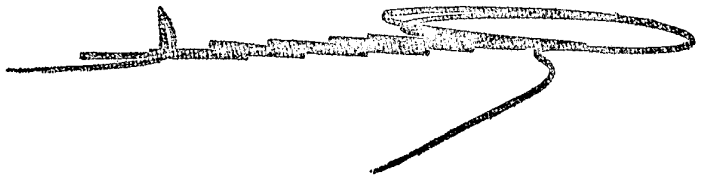
Para os objectivos do método anteriormente descrito é preferível utilizar músculo solear de rato que tenha sido dissecado e do qual se tenham preparado pequenas peças lamelares com a massa aproximada de 25-35-mg, em conformidade com o procedimento descrito por Crettaz, M., et al., Biochem. J 186:525-534 (1980). Essas lâminas musculares são colocadas em recipientes adequados que contenham tampão bicarbonato de Krebs-Ringer contendo 1.2 mM de cálcio gasificado com uma mistura constituida por 95% de O_2/5% de CO_2. O recipiente adequado para essas lâminas musculares é constituido por um balão de Erlenmeyer com a capacidade de 50 ml contendo 4 ml de tampão bicarbonato de Krebs-Ringer gasificado contendo 1.2 mM de cálcio, conforme descrito antes. Embora isso não seja essencial para a prática do método da presente invenção é preferível fazer a incubação das lâminas musculares no referido tampão à temperatura de 37°C (agitando o banho-maria) durante 15 minutos sob uma atmosfera constituida por uma mistura de 95% de O_2/5% de CO_2 seguindo-se uma incubação durante 15 minutos à temperatura de 37°C (com agitação do banho-maria) no referido tampão o qual contem adicionalmente insulina,



amilina e um composto que se pretende ensaiar antes de se efectuar a incubação à temperatura de 37°C em presença de insulina, amilina, glicose radioidentificada e um composto que se pretende ensaiar. Cada uma dessas incubações é efectuada preferencialmente em 4 ml do respectivo tampão em balão de Erlenmeyer com a capacidade de 50ml.

A incubação das lâminas musculares no referido tampão contendo insulina, amilina ou PRGC, glicose radioidentificada e um composto que se pretende ensaiar efectua-se à temperatura de 37°C (agitando o banho-maria) no caso de o tampão ser gasificado com uma mistura constituida por 95% de O_2/5% de CO_2 durante os primeiros 5 minutos e depois durante 55 minutos, também à temperatura de 37°C (agitando o banho-maria) com vasos rolhados. Para os objectivos do método anterior é preferível utilizar insulina para valores de concentração compreendidos entre 10^{-10} M e 10^{-7} M. Também é preferível utilizar amilina de origem humana ou proveniente de rato para valores de concentração compreendidos preferencialmente entre 10^{-10} M e 10^{-7} M. No caso de se utilizar PRGC é preferível que os valores de concentração estejam compreendidos aproximadamente entre 10^{-10} e 10^{-7}. Embora seja possível utilizar uma ampla diversidade de identificadores para radioidentificar a glicose utilizada na presente invenção, é imprescindivel que essa glicose seja radioidentificada de tal modo que ao realizar-se a glicolise seja produzido um produto de glicolise radioidentidicado e detectável. Sendo assim, é preferível utilizar D-[3-H^3]glicose no método da presente invenção. Melhor ainda, é mais preferencial utilizar D-[3-H^3]glicose para a concentração de 0.5 uCi/ml de tampão.

A amilina e o PRGC utilizado na presente invenção podem ser preparados em conformidade com técnicas normalizadas de sintese de proteínas bem conhecidas pelos especialistas na matéria. Mais especificamente, a amilina e o PRGC podem ser produzidos recorrendo à tecnologia do ADN recombinante. Além disso, a amilina e o PRGC podem também ser obtidos comercialmente em Peninsula Laboratories, Inc., 611 Taylor Way, Belmont, California 94002 ou Signa Chemical



CO., P. O. Box 14508, St. Louis, Missouri 63178. A insulina encontra-se comercialmente disponível e pode ser obtida em diversas fontes comerciais tais como Elanco Products Co., Indianapolis, Indiana 46285. A glicose radioidentificada também se encontra comercialmente disponível e pode ser obtida em diversos fornecedores tais como Amersham Corp., 2636 South ClearbrooK, Arlington Heights, Illinois 60065 e New England Nuclear, P. O. Box 80024, Wilmington, Delaware 19880.

Depois de terminado o período de incubação em presença de glicolise radioidentificada, procede-se à remoção das lâminas musculares e submete-se o tampão de incubação a um ensaio para determinação do produto de glicolise radioidentificado. Uma vez que é preferível utilizar D-[3-H^3]glicose no método anteriormente descrito, é preferível submeter o tampão de incubação a um ensaio para verificação da existência de ^3H_2O conforme descrito por Ashcroft, et al., Biochem. J. 126:525-532 (1972). Para o ensaio da ^3H_2O é preferível colocar 100 µl do tampão de incubação e 10 µl de HCl 1N num tubo de microcentrifugação com a capacidade de 1,5 ml sem tampa e depois coloca-se esse tubo num frasco de cintilação contendo 1 ml de H_2O. Depois veda-se o frasco de modo a mentê-lo estanque e procede-se à incubação durante um periodo compreendido aproximadamente entre 18 e 24 horas à temperatura de 60°C para permitir o estabelecimento do equilíbrio da ^3H_2O entre o tubo e o frasco. Depois retira-se o tubo do frasco e procede-se à contagem do ^3H existente no frasco. Os elementos de controlo adequados para os ensaios do produto de glicolise identificado com ^3H_2O são os tubos que contêm 100 µl de ^3H_2O (50 000 - 100 000 cpm) e 10 µl de HCl 1N de modo a permitir corrigir a perfeição do equilibrio da ^3H_2O entre o tubo e o frasco; e tampão contendo insulina, amilina, glicose radioidentificada e o composto mas sem ter sido exposto ao músculo para utilização na determinação de elementos de controlo comparativos a partir do ensaio.

É preferível utilizar amostras em duplicado provenientes de cada tampão de incubação de músculo e efectuar três ou quatro ensaios de equilíbrio de

^3H_2O e de elementos de controlo para comparação. Para se calcular a quantidade de glicolise no tampão de incubação, utilizando os volumes preferenciais e os tempos preferenciais referidos antes, utiliza-se a equação seguinte:

$$\frac{(Y)\ (44)}{\text{Actividade especifica de D-[3-H]}^3\text{ glicose expressa em cpm/nmol}\quad (Z)\quad \text{mg de musculo solear peso húmido}\quad \text{glicolise nmol/hr/mg peso húmido}}$$

em que o símbolo Y representa o valor em cpm do ^3H da amostra menos o valor em cpm correspondente ao controlo comparativo e o simbolo Z representa o valor percentual do estabelecimento de equilíbrio da ^3H_2O.

Como é evidente, o método descrito antes pode ser aplicado, mutatis mutandis, utilizando volumes diferentes e recipientes diferentes e também células musculares em vez de lâminas de músculos. Um especialista na matéria munido dos conhecimentos agora revelados avaliará e determinará facilmente essas variantes e poderá introduzir na equação anterior as modificações adequadas de tal modo que a medição da glicolise possa ser calculada em função dessas variações. Além disso, a presente invenção não fica limitada à determinação da glicolise expressa em nmol/hr/mg (peso húmido). Todas as outras medições adequadas de glicolise se consideram englobadas no âmbito da presente invenção.

Um composto que iniba a capacidade da amilina ou do PRGC para reduzir a glicolise estimulada pela insulina num músculo ou em células musculares é identificado comparando o nível de glicolise, por exemplo, medido em cpm de ^3H presente no tampão de incubação quando o composto se encontra presente, com o correspondente nível quando não existe composto. Para os compostos que originam um produto de glicolise de nível mais elevado, por exemplo, aqueles para os quais se verifica um maior número de cpm do ^3H, é possível concluir que inibem a capacidade da amilina ou do



PRGC para reduzir a glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou em células musculares.

Utilizando o método descrito antes mas sem recorrer a nenhum composto que iniba o efeito da amilina foi possível obter os resultados indicados no Quando I seguinte:

QUADRO I

Músculo solear (mg)	Amilina do rato (M)	Amilina humana (M)	Insulina (10^{-8}M)	Glicolise (nmol/hr/ml) (peso húmido)
32.0	-	-	-	10.1
23.9	-	-	+	17.0
33.8	-	-	-	8.18
28.1	-	-	+	13.0
24.2	10^{-10}	-	+	16.0
34.4	10^{-10}	-	+	10.6
31.7	10^{-9}	-	+	12.5
34.4	10^{-9}_{-8}	-	+	11.4
26.3	10	-	+	13.8
24.2	10^{-8}	-	+	13.1
30.5	10^{-7}	-	+	12.0
34.1	10^{-7}	-	+	11.8
28.2	-	10^{-10}	+	8.47
34.2	-	10^{-10}	+	8.28
29.8	-	10^{-9}	+	9.37
35.3	-	10^{-9}	+	8.38
24.9	-	10^{-8}	+	8.49
25.2	-	10^{-8}	+	11.8
26.7	-	10^{-7}	+	11.4
30.8	-	10^{-7}	+	7.5

Utilizando novamente o método descrito antes mas sem recorrer a nenhum composto que iniba o efeito da amilina amidada no terminal C (sintetizada por Glenn C. Andrews da Pfizer Inc.) e da amilina de origem humana (Penisula Labs. Cat. *7321), foi possível obter os resultados indicados no Quadro II seguinte:

QUADRO II

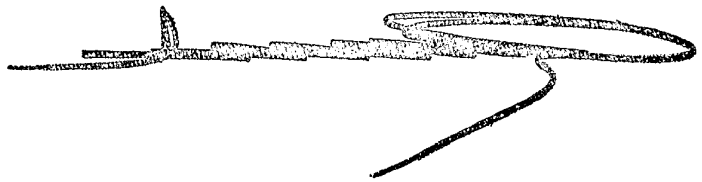
músculo solear (mg)	Insulina (10^{-8}M)	Amilina amidada no terminal C (M)	Amilina humana (M)	Glicolise (nmol/hr/mg) (peso húmido)
34.8	-	-	-	9.5
26.8	+	-	-	12.1
30.9	-	-	-	6.72
30.3	+	-	-	11.5
31.9	+	10^{-11}	-	7.86
33.8	+	10^{-11}	-	10.1
32.2	+	10^{-10}	-	10.8
26.5	+	10^{-10}	-	12.5
28.2	+	10^{-9}	-	8.86
30.7	+	10^{-9}	-	9.80
30.2	+	10^{-8}	-	8.10
31.1	+	10^{-8}	-	7.27
36.0	+	10^{-7}	-	5.43
33.2	+	10^{-7}	-	5.71
33.1	+	-	10^{-9}	7.23
31.6	+	-	10^{-9}	5.91
33.0	+	-	10^{-8}	5.94
23.2	+	-	10^{-8}	6.54
27.4	+	-	10^{-7}	7.46
35.4	+	-	10^{-7}	6.49



Por outro lado, ao utilizar-se o método descrito antes mas sem recorrer à utilização de um composto que iniba o efeito do PRGC do rato (Sigma Cat. *C 0167), foi possível obter os resultados indicados no Quadro III seguinte:

QUADRO III

Músculo solear (mg)	Insulina (10^{-8}M)	PRGC (M)	Glicolise (nmol/hr/mg) (peso húmido)
23.8	-	-	11.3
24.9	+ -	-	18.2
28.0	-	-	14.7
29.9	+	-	12.4
32.5	+	10^{-9}	11.8
31.3	+	10^{-9}	14.6
33.7	+	10^{-8}	5.76
26.7	+	10^{-8}	7.21
30.5	+	10^{-7}	6.49
34.8	+	10^{-7}	6.05



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

- 1ª -

Método para utilizar o peptido relaciondo com o gene da calcitonina ou amilina para reduzir a glicolise estimulada pela insulina no músculo ou nas células musculares, caracterizado por se fazer a incubação do músculo ou das células musculares em presença de uma quantidade de peptido relacionado com o gene da calcitonina ou amilina redutora da glicolise estimulada pela insulina.

- 2ª -

Método de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo facto de a amilina ser proveniente de seres humanos ou de ratos.

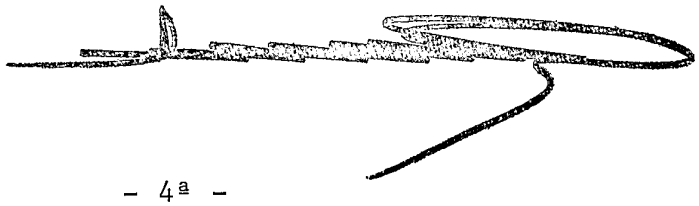
- 3ª -

Método para ensaiar a capacidade de um composto para inibir a redução na glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou em células musculares provocada pelo peptido relacionado com o gene da calcitonina ou amilina caracterizado pelo facto de:

(a) se fazer a incubação do músculo ou das células musculares em presença de insulina, de peptido relacionado com o gene da calcitonina ou amilina, de composto e de glicose radioidentificada;

(b) se proceder à medição da quantidade de produto da glicolise radioidentificado do músculo ou das células musculares incubadas do passo (a); e

(c) se efectuar a comparação da quantidade medida no passo (b) com a quantidade medida pelo método do passo (b) quando o músculo ou as células musculares são incubados em presença de insulina, de peptido relacionado com o gene da calcitonina ou amilina e de glicose radioidentificada.



- 4ª -

Método de acordo com a reivindicação 3 caracterizado pelo facto de a amilina ser proveniente de seres humanos ou de ratos e por o músculo ser rat soleus muscle.

- 5ª -

Método de acordo com a reivindicação 4 caracterizado pelo facto de a insulina estar presente numa concentração compreendida aproximadamente entre 10^{-10} M e 10^{-7} M.

- 6ª -

Método de acordo com a reivindicação 5 caracterizado pelo facto de a amilina proveniente de seres humanos estar presente numa concentração compreendida aproximadamente entre 10^{-10} M e 10^{-7} M e a amilina proveniente dos ratos estar presente numa concentração compreendida aproximadamente entre 10^{-10} M e 10^{-7} M.

- 7ª -

Método de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo facto de a glicose radioidentificada ser glicose tritiada.

- 8ª -

Método de acordo com a reivindicação 3 caracterizado pelo facto de o músculo ou as células musculares serem pré-incubados em presença de insulina, de peptido relacionado com o gene da calcitonina ou amilina, de composto e de glicose antes do passo (a).

A requerente reivindica a prioridade do pedido de patente norte-americano apresentado em 15 de Março de 1991, sob o Nº. 670,536

Lisboa, 12 de Março de 1992

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

R E S U M O

"MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DO PEPTIDO RELACIONADO COM O GENE DA CALCITONINA E AMILINA E CORRESPONDENTES ANTAGONISTAS"

A invenção refere-se à utilização do peptido relacionado com o gene da calcitinina ou amilina (PRGC) para reduzir a glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou nas células musculares. A presente invenção refere-se também a um método para ensaiar a capacidade de um composto para inibir a redução da glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou nas células musculares provocada pelo PRGC ou amilina. Além disso, a presente invenção refere-se aos compostos susceptíveis de inibir a redução na glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou nas células musculares provocada pelo PRGC ou amilina. Esta invenção refere-se também às composições farmacêuticas e aos métodos para inibir a redução na glicolise estimulada pela insulina nos músculos ou nas células musculares no mamífero provocada peloPRC ou amilina.