

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.06.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.06.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/870762**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.10.2000**
(Věstník č. 10/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/11753**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/55144**

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 4360

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 38/22

A 61 P 3/04

(71) Přihlašovatel:

AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC., San Diego,
CA, US;

(72) Původce:

Duft Bradford J., Rancho Santa Fe, CA, US;
Kolterman Orville, Poway, CA, US;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití amylinu nebo agonisty amylinu pro
výrobu léku k léčení nebo prevenci obezity u
člověka**

(57) Anotace:

Je popsáno použití amylinu nebo agonisty amylinu pro výrobu léku k léčení nebo prevenci obezity u člověka. Léčení obezity spočívá v podávání léčebně účinného množství amylinu nebo agonisty amylinu samotného či v kombinaci s jiným agens zmírňujícím obezitu. Kromě toho je popsáno použití amylinu nebo agonisty amylinu pro výrobu léku k redukci hmotnostního přírůstku indukovaného inzulinem, kdy se podává léčebně účinné množství amylinu nebo agonisty amylinu.

CZ 1999 - 4360 A3

18.07.00

71 1999- 4360

177 498/HK

1

Použití amylinu nebo agonisty amylinu pro výrobu léku k léčení nebo prevenci obezity u člověka

Tato přihláška je částečně pokračovací přihláškou k přihlášce U.S. č. 08/870 762, podané 6. června 1997, jejíž obsah je plně zahrnut formou odkazů do této přihlášky.

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká léků k léčení obezity. Konkrétněji se vynález týká použití amylinu nebo agonisty amylinu pro výrobu léku k léčení nebo prevenci obezity u člověka

Dosavadní stav techniky

Amylin

Struktura a biologie amylinu byly uvedeny v přehledných publikacích již dříve, viz například Rink et al., Trends in Pharmaceutical Sciences, 14, 113-118, 1993, Gaeta a Rink, Med. Chem. Res., 3, 483-490, 1994, a Pittner et al., J. Cell. Biochem., 55S, 19-28, 1994. Amylin je proteinový hormon o 37 aminokyselinách. Byl izolován, purifikován a chemicky charakterizován jako hlavní složka amyloidových depozit v ostrůvcích pankreatu zemřelých lidí s diabetem typu 2 (Cooper et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 8628-8632, 1987). Po translaci v molekule amylinu nastanou dvě důležité modifikace: C-konec je amidován (tj. 37. aminokyselinový zbytek je tyrosinamid) a cysteiny v pozicích 2 a 7 jsou navázány, takže vznikne N-koncová smyčka (prostřednictvím

cystinového zbytku). Sekvence otevřeného čtecího rámce lidského amylinového genu ukazuje přítomnost Lys-Arg dibazického aminokyselinového proteolytického štěpného signálu, před N-koncovým kodonem pro Lys, a Gly před Lys-Arg proteolytickým signálem v C-koncové pozici, typická sekvence pro amidaci prostřednictvím proteinového amidačního enzymu, PAM (Cooper et al., Biochem. Biophys. Acta, 1014, 247-258, 1989). Amylin byl popsán a nárokován v Patentu Spojených Států č. 5 367 052, uděleném 22. listopadu 1994.

Prokázalo se, že u diabetu typu I je množství amylinu nepostačující a jako léčba preferovaná oproti léčbě samotným inzulínem u všech forem diabetu byla navržena náhrada inzulínu v kombinaci s amylinem. Použití amylinu a dalších agonistů amylinu pro léčbu *diabetes mellitus* je předmětem Patentu Spojených Států č. 5 175 145, uděleného 29. prosince 1992. Farmaceutické přípravky obsahující amylin a amylin plus inzulín jsou popsány a nárokovány v Patentu Spojených států č. 5 124 314, uděleném 23. června 1992.

Bylo uvedeno, že přebytek působení amylinu napodobuje významné rysy diabetu typu 2 a jako nová léčebná strategie byla navržena blokáda amylinu. V patentu U.S. č. 5 266 561, uděleném 30. listopadu 1993, bylo odhaleno, že amylin působí snížení inkorporace značené glukózy do glykogenu v kosterních svalech, a to bazální inkorporace i stimulované inzulínem. Bylo odhaleno, že druhý účinek je také sdílen peptidem majícím vztah ke kalcitoninovému genu (CGRP) (viz také Leighton a Cooper, Nature, 335, 632-635, 1988). Bylo také publikováno, že amylin snižuje inzulínem stimulované vychytávání glukózy kosterním svalstvem a snižuje obsah glykogenu (Young et al., Amer. J. Physiol., 259, 45746-1, 1990). Je již popsáno léčení diabetu typu 2 a inzulínové rezistence pomocí antagonistů amylinu.

Sekvence amylinu je z přibližně 50 % homologní se sekvencí CGRP, a také se 37 aminokyselinami proteinů, které jsou rozšířenými neurotransmitery s moha silnými biologickými účinky, včetně vazodilatace. Amylin a CGRP sdílejí disulfidový můstek $^2\text{Cys}-^7\text{Cys}$ a C-koncový aminokyselinový amidový zbytek, oba jsou nezbytné pro plnou biologickou aktivitu (Cooper et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:7763-7766, 1988). Bylo publikováno, že amylin je možná člen rodiny příbuzných peptidů, které zahrnují CGRP, inzulin, růstové faktory podobné inzulinu a relaxiny a které sdílejí společný genetický základ (Cooper et al., Prog. Growth Factor Research, 1, 99-105, 1989).

Amylin je primárně syntetizován v pankreatických beta-buňkách a je secernován jako odpověď na výživové stimuly, jako je glukóza a arginin. Studie s klonovanými nádorovými liniemi z beta-buněk (Moore et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 179(1), 1991) ukázaly, že výživové sekreční podněty, jako je glukóza a arginin stimulují uvolňování amylinu, a také inzulinu. Molární poměr amylin:inzulin secernovaných proteinů kolísá mezi preparáty od přibližně 0,01 do 0,4, ale ukazuje se, že nekolísá mnoho s akutními podněty v každém preparátu. Ale během dlouhotrvající stimulace zvýšenou glukózou se poměr amylin:inzulin může progresivně zvyšovat (Gedulin et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 180(1), 782-789, 1991). Amylin a inzulin nejsou vždy secernovány v konstantním poměru.

Bylo objeveno a publikováno, že určitý účinek amylinu je podobný některým nemetabolickým účinkům CGRP a kalcitoninu, ale metabolické účinky amylinu objevené během výzkumu tohoto nově identifikovaného proteinu se zdají odrážet jeho primární biologickou úlohu. Alespoň některé z těchto metabolických

účinků jsou napodobovány CGRP, třebaže v dávkách, které jsou významně vazodilatační (viz např. Leighton et al., Nature, 335, 632-635, 1988, Molina et al., Diabetes, 39, 260-265, 1990).

První objevený účinek amylinu bylo snížení inzulinem stimulované inkorporace glukózy do glykogenu v kosterním svalstvu potkanů (Leighton et al., Nature, 335, 632-635, 1988), sval se stal „rezistentním na inzulin“. Pozdější práce s *m. soleus* potkana *ex vivo* a *in vitro* ukázala, že amylin snižuje aktivitu glykogensyntetázy, podporuje konverzi glykogenfosforylázy z inaktivní formy b na aktivní formu a, podporuje čistou ztrátu (odborávání) glykogenu (v přítomnosti či nepřítomnosti inzulinu), zvyšuje hladiny glukózo-6-fosfátu a může zvýšit tvorbu laktátu (viz např. Deems et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 181(1), 116-120, 1991, Young et al., FEBS Letts., 281(1,2), 149-151, 1991). Zdá se, že amylin neovlivňuje transport glukózy *per se* (např. Pittner et al., FEBS Letts., 365(1), 98-100, 1995). Studie vztahu amylinu a inzulinu závislého na dávce ukazují, že amylin působí jako nekompetitivní nebo funkční antagonist inzulínu v kosterním svalu (Young et al., Am. J. Physiol., 263(2), E274-E281, 1992). Není žádný důkaz, že amylin interferuje s vazbou inzulinu na jeho receptory nebo s následnou aktivací inzulinového receptoru tyrozinkinázou (Follert et al., Clinical Research, 39(1), 39A, 1991, Koopmans et al., Diabetologia, 34, 218-224, 1991).

Má se za to, že amylin působí prostřednictvím receptorů přítomných v plazmatických membránách. Studie amylinu a CGRP a účinek selektivních antagonistů svědčí pro to, že amylin působí prostřednictvím svého vlastního receptoru (Beaumont et al., Br. J. Pharmacol., 115(5), 713-715, 1995, Wang et al., FEBS Letts., 219, 195-198, 1991 b), což odporuje závěru

jiných vědců, že amylin může působit primárně na receptory CGRP (např. Chantry et al., Biochem. J., 277, 139-143, 1991, Galeazza et al., Peptides, 12, 585-591, 1991, Zhu et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 177(2), 771-776, 1991). Amylinové receptory a jejich použití v metodách pro screening a testování na amylinové agonisty a antagonisty jsou popsány v Patentu Spojených Států č. 5 264 372, uděleném 23. listopadu 1993.

Zatímco amylin má výrazné účinky na jaterní zásobní ("fuel") metabolismus *in vivo*, neexistuje obecná shoda co se týče toho, jaký účinek amylinu se pozoruje v izolovaných hepatocytech nebo perfundovaných játrech. Dostupná data nejsou příliš v souladu s představou, že amylin podporuje jaterní glykogenolýzu, tj. nepůsobí jako glukagon (např. Stephens et al., Diabetes, 40, 395-400, 1991, Gomez-Foix et al., Biochem. J., 276, 607-610, 1991). Bylo navrženo, že amylin může působit na játra tak, že podporuje konverzi laktátu na glykogen a zvyšuje množství glukózy, kterou je možné uvolnit glukagonem (viz Roden et al., Diabetologia, 35, 116-120, 1992). Tímto způsobem by amylin mohl působit jako anabolický partner inzulínu v játrech na rozdíl od svého katabolického působení ve svalech.

V tukových buňkách nemá na rozdíl od svého působení ve svalech amylin pozorovatelný účinek na vychytávání glukózy stimulované inzulínem, inkorporaci glukózy do triglyceridů, tvorbu CO₂ (Cooper et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 7763-7766, 1988), lipolýzu stimulovanou epinefrinem nebo inzulínovou inhibici lipolýzy (Lupien a Young, „Diabetes Nutrition and Metabolism - Clinical and Experimental“, díl 6(1), 1318, únor 1993). Amylin tak projevuje účinky tkáňové specifické s přímým působením na kosterní sval, výrazné nepřímé (prostřednictvím zásoby substrátu) a snad přímé

působení na játra, zatímco se adipocyty jeví „slepé“ k přítomnosti nebo nepřítomnosti amylinu.

Bylo také publikováno, že amylin může mít výrazný vliv na sekreci inzulinu. Pokusy na nedotčených laboratorních potkanech (Young et al., Mol. Cell. Endocrinol., 84, R1-R5, 1992) ukazují, že amylin inhibuje sekreci inzulinu. Ale jiní vědci nemohli zjistit působení amylinu na izolované β -buňky, na izolované ostrůvky nebo na celé zvíře (viz Broderick et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 177, 932-938, 1991).

Amylin nebo agonisté amylinu silně inhibují vyprazdňování žaludku u potkanů (Young et al., Diabetologia, 38(6), 642-648, 1995), psů (Brown et al., Diabetes, 43, (suppl. 1), 172A, 1994) a u lidí (Macdonald et al., Diabetologia, 38 (Suppl. 1), A32 (abstrakt 118), 1995). Bylo publikováno, že vyprazdňování žaludku je urychleno u amylin deficitních laboratorních potkanů BB s diabetem typu 1 (Young et al., Diabetologia, výše, Nowak et al., J. Lab. Clin. Med., 123(1), 110-6, 1994) a u potkanů léčených selektivním antagonistou amylinu, AC187 (Gedulin et al., Diabetologia, 38 (suppl. 1), A244, 1995). Zdá se, že účinek amylinu na vyprazdňování žaludku je fyziologický (účinný v koncentracích, které jsou normálně v oběhu).

Nemetabolické působení amylinu zahrnuje vazodilatační účinek, který může být zprostředkovaný interakcí s vaskulárními receptory CGRP. Publikované pokusy *in vivo* svědčí pro to, že amylin je jako vazodilatátor přinejmenším přibližně 100 až 1000 x méně účinný než CGRP (Brain et al., Eur. J. Pharmacol., 183, 2221, 1990, Wang et al., FEBS Letts., 291, 195-198, 1991). Byl publikován účinek amylinu na regionální hemodynamickou činnost včetně průtoku krve ledvinami u potkanů při vědomí (Gardiner et al., Diabetes, 40, 948-951, 1991). Autoři si povšimli, že infúze potkaního

amylinu byla sdružena s větší vazodilatací renálních cév a menší vazokonstrikcí mezenterických cév, než co se pozoruje při infúzi lidského α -CGRP. Vyvodili závěr, že větší podporou renální hyperémie, než činí α -CGRP, může potkaní amylin způsobit méně výraznou stimulaci systému renin-angiotenzin, a tedy menší vazokonstrikci zprostředkovanou sekundárně angiotenzinem II. Bylo také ale pozorováno, že během současné infúze lidského α -⁸⁻³⁷CGRP a potkaního amylinu, byla odhalena vazokonstrikce renálních a mezenterických cév, pravděpodobně díky bez odporu přijímaného vazokonstrikčního působení angiotenzinu II, a že tento nález je podobný výsledku pozorovanému během společné infúze lidského A-CGRP a lidského α -⁸⁻³⁷CGRP (ibid., 951).

Bylo také publikováno, že amylin působí jak na izolované osteoklasty, kde způsobuje klidové stádium buněk, tak *in vivo*, kdy snižuje plazmatickou hladinu kalcia až na 20 % u potkanů, u králíků a u lidí s Pagetovou nemocí (viz např. Zaidi et al., Trends in Endocrinol. and Metab., 4, 255-259, 1993). Dostupná data svědčí pro to, že amylin je při tomto působení 10 až 30 x méně účinný než lidský kalcitonin. Je zajímavé, že podle publikací se ukazuje, že amylin zvyšuje produkci cAMP osteoklasty, ale nezvyšuje Ca^{2+} v cytosolu, zatímco kalcitonin je účinný v obou případech (Alam et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 179(1), 134-139, 1991). Bylo navrženo, i když neověřeno, že kalcitonin může působit prostřednictvím dvou typů receptorů a že amylin může interagovat s jedním z nich.

Bylo také objeveno, že amylin výrazně zvyšuje aktivitu reninu v plazmě u nedotčených potkanů, je-li podáván subkutánně tak, aby se zabránilo jakémukoliv porušení krevního tlaku, což je překvapivé vzhledem k jeho dříve popsané schopnosti působit vazodilatačně v ledvinách a jeho

dalším vlastnostem. Je důležité nezměnit krevní tlak, neboť jeho snížení je silný podnět pro uvolňování reninu. Antagonisté amylinu, jako jsou antagonisté amylinového receptoru, včetně těch, které jsou ve srovnání s CGRP receptory a/nebo kalcitoninovými receptory selektivní pro amylinové receptory, mohou být použity pro blokování vzestupu plazmatické aktivity reninu vyvolaného amylinem. Použití antagonistů amylinu k léčbě chorob spojených s reninem je popsáno a nárokováno v Patentu Spojených Států U.S. č. 5 376 638, uděleném 27. prosince, 1994.

Bylo publikováno, že u zdravých lidí jsou hladiny amylinu nalačno od 1 do 10 pM a postprandiální hladina nebo hladina po podání glukózy 5 až 20 pM (např. Koda et al., The Lancet, 339, 1179-1180, 1992). U obézních jedinců rezistentních na inzulin mohou být hladiny amylinu po jídle zvýšené a dosahovat až přibližně 50 pM. Pro srovnání, hodnoty inzulinu nalačno a postprandiálně jsou 20 až 50 pM a 100 až 300 pM u zdravých lidí, u lidí rezistentních na inzulin jsou hladiny asi 3 až 4 x vyšší. U diabetu typu 1, kdy jsou zničeny beta-buňky, jsou hladiny amylinu v rozmezí hladin detekce nebo pod nimi a v odpověď na glukózu nestoupají (Koda et al., The Lancet, 339, 1179-1180, 1992). Bylo publikováno, že u zdravých myší a potkanů jsou bazální hladiny amylinu od 30 do 100 pM, zatímco u určitých diabetických kmenů hlodavců rezistentních na inzulin byly naměřeny hodnoty až do 600 pM (např. Huang et al., Hypertension, 19, I-101-I-109, 1991).

Bylo publikováno, že amylin při injekci do mozku nebo periferním podáváním snižuje příjem potravy (např. Chance et al., Brain Res., 539, 352-354, 1991, a Chance et al., Brain Res., 607, 185-188, 1993), účinek, který sdílí s CGRP a kalcitoninem. Účinná koncentrace v buňkách, které zprostředkovávají toto působení, není známa. Použití amylinu

a agonistů amylinu pro léčení anorexie je popsáno nárokováno v Patentu Spojených Států č. 5 656 590, uděleném 12. srpna 1997. Přípravky obsahující agonistu cholecystokininu a agonistu amylinu nebo hybridní molekulu pro použití v redukci příjmu potravy nebo ke kontrole chuti k jídlu nebo tělesné hmotnosti jsou popsány a nárokovány v Patentu Spojených Států č. 5 739 106, uděleném 14. dubna 1998.

Obezita

Obezita je chronická nemoc, která má v moderní společnosti vysokou prevalenci a je spojena nejen se sociálním stigmatem, ale také se zkrácenou délkou života a četnými zdravotními problémy, včetně nepříznivého duševního vývoje, reprodukčních poruch, jako jsou polycystické vaječníky, dermatologických nemocí jako jsou infekce, varikózní žíly, *acanthosis nigricans* a ekzém, pohybová intolerance, *diabetes mellitus*, rezistence na inzulín, hypertenze, hypercholesterolémie, cholelitiáza, osteoartritida, ortopedická poranění, tromboembolická nemoc, rakovina a ischemická choroba srdeční (Rissanen et al., *British Medical Journal*, 301, 835-837, 1990).

Obezita, zejména obezita horní části těla, je častý a velmi vážný obecný zdravotní problém ve Spojených Státech a na celém světě. Podle nedávné statistiky má více než 25 % populace Spojených Států a 27 % kanadské populace nadváhu. (Kuczmarski, *Amer. J. of Clin. Nut.*, 55, 495S-502S, 1992, Reeder et al., *Can. Med. Ass. J.*, 23, 226-233, 1992). Obezita horní části těla je nejsilnější známý rizikový faktor pro vznik *diabetes mellitus* II. typu a je to silný rizikový faktor pro vznik kardiovaskulárních chorob, a také rakoviny. Nedávné odhady světových výdajů na léčbu obezity jsou

150 000 000 000 dolarů. Problém se stal natolik vážný, že úřad hlavního lékaře zahájil iniciativu na potírání stále narůstající otylosti hojně rozšířené v americké společnosti.

Mnoho z těchto obezitou vyvolaných patologických stavů se může připisovat silné vazbě s dyslipidemií, hypertenzí a inzulinovou rezistencí. Mnoho studií prokázalo, že redukce obezity dietou a cvičením tyto rizikové faktory dramaticky snižuje. Naneštěstí je tato léčba většinou neúspěšná s mírou selhání dosahující 95 %. Selhání může být způsobeno faktem, že tento stav je v silné asociaci s geneticky zděděnými faktory, které přispívají ke zvýšené chuti k jídlu, preferenci vysoce kalorické potravy, ke snížené fyzické aktivitě a zvýšenému lipogennímu metabolismu. To svědčí pro to, že lidé, kteří zdělili tyto genetické znaky, mají sklon k obezitě bez ohledu na úsilí s ní bojovat. Proto je zapotřebí nové léčivo, které může upravit tuto nevýhodu a umožní lékařům úspěšně léčit obézní pacienty navzdory jejich genetickému dědictví.

Dosavadní léčení obezity zahrnuje standardní diety a cvičení, diety s velmi malým přívodem kalorií, behaviorální terapii, farmakoterapii zahrnující léky potlačující chuť k jídlu, termogenní léky, inhibitory absorpce potravin, mechanické prostředky, jako je sdrátování čelistí, opaskové šňůry a balónky a chirurgické zákroky. (Jung a Chong, *Clinical Endocrinology*, 35, 11-20, 1991, Bray, *Am. J. Clin. Nutr.*, 55, 538S-544S, 1992). Publikovalo se, že při redukci hmotnosti u dospívajících bylo účinné modifikované hladovění šetřící proteiny (Lee et al., *Clin. Pediatr.*, 31, 234-236, duben 1992). Snížení kalorického příjmu jako léčení obezity způsobuje katabolismus zásob tělesných proteinů a vytváří negativní dusíkovou bilanci. Proto získaly popularitu diety s doplňkem proteinů jako způsob snížení ztráty dusíku při

snížení kalorického příjmu. Protože takové diety šetří dusík pouze mírně, je zapotřebí účinnější způsob pro zachování netučné tělesné hmoty a proteinových zásob. Kdyby takový režim měl kromě toho také za následek zrychlenou ztrátu tělesného tuku, byla by zlepšena léčba obezity. Různé přístupy k takovému léčení zahrnují způsoby uváděné autory Wintraub a Bray (Med. Clinics N. Amer., 73, 237, 1989, Bray, Nutrition Reviews, 49, 33, 1991).

Vzhledem k vysoké prevalenci obezity v naší společnosti a vážným následkům s ní spojených, jak jsou projednány výše, každé léčivo potenciálně použitelné pro snížení hmotnosti obézních osob by mělo skutečně prospěšný účinek na jejich zdraví. Je zapotřebí léčivo, které bude snižovat celkovou tělesnou hmotnost obézních pacientů na jejich ideální tělesnou hmotnost a bude pomáhat sníženou úroveň hmotnosti udržet.

Podstata vynálezu

Nyní jsme překvapivě zjistili, že amylin a agonisté amylinu, například analog agonisty amylinu ^{25,28,29}Pro-h-amylin (také nazývaný jako „pramlintid“ a dříve nazývaný „AC-0137“), mohou být použity pro léčení obezity u lidí.

Předkládaný vynález se týká nových způsobů léčení nebo prevence obezity u lidí, které zahrnují podávání amylinu nebo agonisty amylinu, například analogu agonisty amylinu ^{25,28,29}Pro-h-amylinu. Amylin nebo agonista amylinu může být podáván samotný nebo ve spojení s jinými agens odstraňujícími obezitu. V jednom aspektu se vynález týká způsobu léčení obezity u lidí, který zahrnuje podávání účinného množství amylinu nebo agonisty amylinu uvedenému subjektu. „Léčením“

se rozumí vedení pacienta a péče o něj za účelem potírání nemoci, chorobného stavu nebo poruchy a zahrnuje podávání amylinu nebo agonisty amylinu pro zabránění propuknutí symptomů nebo komplikací, zmírnění symptomů nebo komplikací nebo odstranění chorobného stavu či poruchy. Léčení obezity tudíž zahrnuje potlačení nárůstku hmotnosti a vyvolání ztráty hmotnosti u pacienta, který to potřebuje. Kromě toho se léčením obezity míní, že zahrnuje kontrolu hmotnosti z kosmetických důvodů u lidí, což je kontrola tělesné hmotnosti pro zlepšení tělesného vzhledu.

Rozumí se, že termín „amylin“ v tomto popisu zahrnuje sloučeniny, jak jsou vymezeny v Patentu Spojených Států č. 5 234 906, uděleném 10. srpna 1993, pro „Hyperglykemické přípravky“, jehož obsah je formou odkazů zahrnut zde. Například zahrnuje lidský peptidový hormon uváděný jako amylin secernovaný pankreatickými beta-buňkami a jeho druhové varianty. „Agonista amylinu“ je také termín v oboru známý a týká se sloučeniny, která napodobuje účinky amylinu. Agonista amylinu může být peptid nebo nepeptidová sloučenina a zahrnuje také analogy agonisty amylinu.

Rozumí se, že termín „analog agonisty amylinu“ se vztahuje k derivátům amylinu, v současnosti se má za to, že působí jako agonisté amylinu normálně na základě vazby s receptorem amylinu nebo jinak přímo či nepřímo interagují s amylinovým receptorem nebo jiným receptorem nebo receptory, se kterými může interagovat samotný amylin, aby vyvolal biologickou odpověď. Použitelné analogy agonisty amylinu zahrnují ty, které jsou uvedeny v mezinárodní přihlášce, WPI rejstřík. č. 93-182488/22 s názvem „New Amylin Agonist Peptides Used for Treatment and Prevention of Hypoglycemia and Diabetes Mellitus“, jejíž obsah je zde také zahrnut formou odkazu.

Ve výhodném provedení je agonista amylinu analog agonisty amylinu, výhodně ^{25,28,29}Pro-h-amylin. ^{25,28,29}Pro-h-amylin a další analogy agonisty amylinu jsou popsány a nárokovány v Patentu Spojených Států č. 5 686 411, uděleném 11. listopadu 1997, jehož obsah je zde zahrnut formou odkazu.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká nových způsobů redukce přírůstku hmotnosti indukovaného inzulinem u lidí, kteří jsou léčeni inzulinem, a to podáváním léčebně účinného množství amylinu nebo agonisty amylinu. V jednom provedení má pacient *diabetes mellitus*, například *diabetes mellitus* typu 1 nebo 2. Ve výhodném provedení je agonista amylinu ^{25,28,29}Pro-h-amylin.

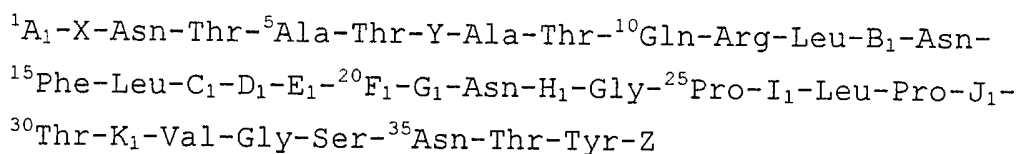
Detailní popis vynálezu

Studie popsaná v příkladu 1 prokázala, že podávání agonisty amylinu ^{25,28,29}Pro-h-amylinu (pramlintidu) diabetikům užívajícím inzulin (typu 2) mělo za následek snížení tělesné hmotnosti po 4 týdnech, což dosáhlo statistické významnosti ve dvou skupinách, u dávek 60 µg TID a 60 µg QID. Studie popsaná v příkladu 2 ukázala, že podávání pramlintidu (30 µg nebo 60 µg QID) pacientům s diabetem typu 1 mělo za následek statisticky významné snížení tělesné hmotnosti ve srovnání s placebem po 13, 26 a 52 týdnech. Studie popsaná v příkladu 3 ukázala, že podávání pramlintidu (30, 75 nebo 150 µg TID) pacientům s diabetem typu 2, kteří vyžadují inzulin, mělo za následek statisticky významné snížení tělesné hmotnosti ve srovnání s placebem po 13, 26 a 52 týdnech. Tyto výsledky jsou v ostrém kontrastu s léčbou samotným inzulinem u pacientů s diabetem typu 1 nebo typu 2, která je obvykle spojena s přírůstkem hmotnosti.

Analogy agonisty amylinu použitelné v tomto vynálezu zahrnují analogy agonisty amylinu popsané a nárokované ve

výše zmíněném Patentu U.S. č. 5 686 411. Agonisté amylinu zahrnují následující analogy agonistů amylinu:

1. Analog agonisty amylinu mající aminokyselinovou sekvenci:



kde

A_1 je Lys, Ala, Ser nebo vodík,

B_1 je Ala, Ser nebo Thr,

C_1 je Val, Leu nebo Ile,

D_1 je His nebo Arg,

E_1 je Ser nebo Thr,

F_1 je Ser, Thr, Gln nebo Asn,

G_1 je Asn, Gln nebo His,

H_1 je Phe, Leu nebo Tyr,

I_1 je Ile, Val, Ala nebo Leu,

J_1 je Ser, Pro nebo Thr,

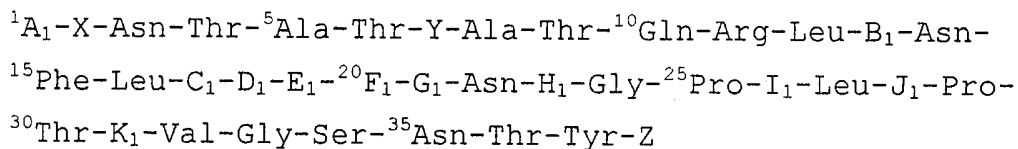
K_1 je Asn, Asp nebo Gln,

X a Y jsou nezávisle vybrané zbytky mající postranní řetězce, které jsou chemicky vázány k sobě navzájem za vzniku intramolekulární vazby, přičemž uvedená intramolekulární vazba obsahuje disulfidovou vazbu, laktamovou nebo thioéterovou vazbu; a

Z je aminoskupina, alkylamino-, dialkylamino-, cykloalkylamino-, arylamino-, aralkylamino-, alkyloxy-, aryloxy- nebo aralkyloxyskupina; a za předpokladu, že když A_1 je Lys, B_1 je Ala, C_1 je Val, D_1 je Arg, E_1 je Ser, F_1 je Ser, G_1 je Asn, H_1 je Leu, I_1 je Val, J_1 je Pro a K_1 je Asn; pak jeden nebo více z A_1 až K_1 je D-aminokyselina a Z je vybráno ze skupiny obsahující alkylaminoskupinu, dialkylamino-,

cykloalkylamino-, arylamino-, aralkylamino-, alkyloxy-, aryloxy- nebo aralkyloxyoskupinu.

2. Analog agonisty amylinu mající aminokyselinovou sekvenci:



kde

A_1 je Lys, Ala, Ser nebo vodík,

B_1 je Ala, Ser nebo Thr,

C_1 je Val, Leu nebo Ile,

D_1 je His nebo Arg,

E_1 je Ser nebo Thr,

F_1 je Ser, Thr, Gln nebo Asn,

G_1 je Asn, Gln nebo His,

H_1 je Phe, Leu nebo Tyr,

I_1 je Ile, Val, Ala nebo Leu,

J_1 je Ser, Pro, Leu, Ile nebo Thr,

K_1 je Asn, Asp nebo Gln,

X a Y jsou nezávisle vybrané zbytky mající postranní řetězce, které jsou chemicky vázány k sobě navzájem za vzniku intramolekulární vazby, přičemž uvedená intramolekulární vazba obsahuje disulfidovou vazbu, laktamovou nebo thioéterovou vazbu; a

Z je aminoskupina, alkylamino-, dialkylamino-, cykloalkylamino-, arylamino-, aralkylamino-, alkyloxy-, aryloxy- nebo aralkyloxyskupina; a za předpokladu, že když

a) A_1 je Lys, B_1 je Ala, C_1 je Val, D_1 je Arg, E_1 je Ser, F_1 je Ser, G_1 je Asn, H_1 je Leu, I_1 je Val, J_1 je Pro a K_1 je Asn; nebo

b) A₁ je Lys, B₁ je Ala, C₁ je Val, D₁ je His, E₁ je Ser, F₁ je Asn, G₁ je Asn, H₁ je Leu, I₁ je Val, J₁ je Ser a K₁ je Asn;

pak jeden nebo více z A₁ až K₁ je D-aminokyselina a Z je vybráno ze skupiny obsahující alkylaminoskupinu, dialkylamino-, cykloalkylamino-, arylamino-, aralkylamino-, alkyloxy-, aryloxy- nebo aralkyloxyoskupinu.

3. Analog agonisty amylinu mající aminokyselinovou sekvenci:

¹A₁-X-Asn-Thr-⁵Ala-Thr-Y-Ala-Thr-¹⁰Gln-Arg-Leu-B₁-Asn-
¹⁵Phe-Leu-C₁-D₁-E₁-²⁰F₁-G₁-Asn-H₁-Gly-²⁵I₁-J₁-Leu-Pro-Pro-
³⁰Thr-K₁-Val-Gly-Ser-³⁵Asn-Thr-Tyr-Z

kde

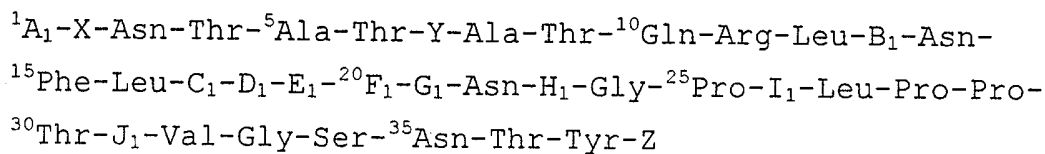
A₁ je Lys, Ala, Ser nebo vodík,
 B₁ je Ala, Ser nebo Thr,
 C₁ je Val, Leu nebo Ile,
 D₁ je His nebo Arg,
 E₁ je Ser nebo Thr,
 F₁ je Ser, Thr, Gln nebo Asn,
 G₁ je Asn, Gln nebo His,
 H₁ je Phe, Leu nebo Tyr,
 I₁ je Ala nebo Pro,
 J₁ je Ile, Val, Ala nebo Leu,
 K₁ je Asn, Asp nebo Gln,

X a Y jsou nezávisle vybrané zbytky mající postranní řetězce, které jsou chemicky vázány k sobě navzájem za vzniku intramolekulární vazby, přičemž uvedená intramolekulární vazba obsahuje disulfidovou vazbu, laktamovou nebo thioéterovou vazbu; a

Z je aminoskupina, alkylamino-, dialkylamino-, cykloalkylamino-, arylamino-, aralkylamino-, alkyloxy-,

aryloxy- nebo aralkyloxyskupina; a za předpokladu, že když A_1 je Lys, B_1 je Ala, C_1 je Val, D_1 je Arg, E_1 je Ser, F_1 je Ser, G_1 je Asn, H_1 je Leu, I_1 je Pro, J_1 je Val a K_1 je Asn; pak jeden nebo více z A_1 až K_1 je D-aminokyselina a Z je vybráno ze skupiny obsahující alkylaminoskupinu, dialkylamino-, cykloalkylamino-, arylamino-, aralkylamino-, alkyloxy-, aryloxy- nebo aralkyloxyoskupinu.

4. Analog agonisty amylinu mající aminokyselinovou sekvenci:



kde

A_1 je Lys, Ala, Ser nebo vodík,
 B_1 je Ala, Ser nebo Thr,
 C_1 je Val, Leu nebo Ile,
 D_1 je His nebo Arg,
 E_1 je Ser nebo Thr,
 F_1 je Ser, Thr, Gln nebo Asn,
 G_1 je Asn, Gln nebo His,
 H_1 je Phe, Leu nebo Tyr,
 I_1 je Ile, Val, Ala nebo Leu,
 J_1 je Asn, Asp nebo Gln,

X a Y jsou nezávisle vybrané zbytky mající postranní řetězce, které jsou chemicky vázány k sobě navzájem za vzniku intramolekulární vazby, přičemž uvedená intramolekulární vazba obsahuje disulfidovou vazbu, laktamovou nebo thioéterovou vazbu; a

Z je aminoskupina, alkylamino-, dialkylamino-, cykloalkylamino-, arylamino-, aralkylamino-, alkyloxy-, aryloxy- nebo aralkyloxyskupina; a za předpokladu, že když A_1

je Lys, B₁ je Ala, C₁ je Val, D₁ je Arg, E₁ je Ser, F₁ je Ser, G₁ je Asn, H₁ je Leu, I₁ je Val a J₁ je Asn; pak jeden nebo více z A₁ až K₁ je D-aminokyselina a Z je vybráno ze skupiny obsahující alkylaminoskupinu, dialkylamino-, cykloalkylamino, arylamino-, aralkylamino-, alkyloxy-, aryloxy- nebo aralkyloxyoskupinu.

Výhodné analogy agonistů amylinu zahrnují ^{25,28,29}Pro-h-amylin, ¹⁸Arg^{25,28,29}Pro-h-amylin a ¹⁸Arg^{25,28}Pro-h-amylin.

Aktivita agonistů amylinu může být potvrzena a kvantifikována provedením různých screeningových testů včetně testu vazby receptorů v *nucleus accumbens* popsaném níže v příkladu 7, pak následuje test na *m. soleus* popsaný níže v příkladu 8, test vyprazdňování žaludku popsaný níže v příkladu 9 nebo 10 nebo test schopnosti indukovat hypokalcémii nebo snižovat u savců postprandiální hyperglykémii, jak je popsáno zde.

Test vazby receptorů, kompetitivní test, který měří schopnost sloučenin specificky se navázat na amylinové receptory vázané v membráně, je popsán a nárokován v Patentu U.S. č. 5 264 372, uděleném 23. listopadu 1993, jehož popis je zde zahrnut formou odkazu. Test vazby receptorů je také popsán v příkladu 7 níže. Výhodný zdroj membránových preparátů použitých v testu je bazální přední mozek, který obsahuje membrány z *nucleus accumbens* a okolních oblastí. Testované sloučeniny kompetují o vazbu k těmto přípravkům receptorů s potkaním amylinem ¹²⁵I Bolton Hunter. Kompetiční funkce, kde navázané množství (B) je vyneseno jako funkce logaritmu koncentrace ligandu, byly analyzovány pomocí počítače, a sice užitím nelineární regrese pro 4 parametrovou logistickou rovnici (program Inplot, GraphPAD Software, San Diego, Kalifornie) nebo programem ALLFIT autorů DeLean

et al., (ALLFIT, verze 2.7 (NIH, Bethesda, MD 20892). (Munson a Rodbard, Anal. Biochem., 107, 220-239, 1980).

Testy biologické aktivity agonistů amylinu na svalu *m. soleus* se mohou provádět s použitím dříve popsáných metod (Leighton, B. a Cooper, Nature, 335, 632-635, 1988, Cooper et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7763-7766, 1988), ve kterých může být aktivita agonisty amylinu stanovena měřením inhibice syntézy glykogenu stimulované inzulinem. Test na *m. soleus* je také popsán v příkladě 8 níže.

Metody měření rychlosti vyprazdňování žaludku jsou popsány například v práci Young et al. (Diabetologia, 38(6), 642-648, 1995). V metodě s fenolovou červení, která je popsána v příkladu 9 níže, dostávají potkani při vědomí gastrickou sondou bezbarvý gel obsahující metylcelulózu a indikátor fenolovou červeň. Dvacet minut po nakrmení je zvířatům podána anestezie s použitím halotanu, žaludek je odkryt a v místě svěrače v pyloru a spodního jícnového svěrače je uzavřen svorkami, žaludek je pak vyňat a otevřen v alkalickém roztoku. Obsah žaludku se odvodí z intenzity fenolové červeně v alkalickém roztoku, měřené pomocí absorbance při vlnové délce 560 nm. Při použití metody s glukózou značenou tritiem, která je popsána v příkladu 10 níže, jsou potkani při vědomí nakrmení roztokem značené glukózy ve vodě. Potkanům je šetrně odebrána krev z ocasu, jehož špička je umrtvena lidokainem. Tritium v plazmě oddělené z krve odebrané z ocasu se odebírá v různých časových intervalech a určuje se na počítači beta impulzů. Testované sloučeniny se normálně podávají přibližně jednu minutu před nakrmením.

Účinky amylinu nebo agonistů amylinu na tělesnou hmotnost se určují, hodnotí nebo testují s použitím metod popsáných v příkladech 1-3 níže nebo jinými metodami v oboru

známými či analogickými metodami zjišťujícími ovlivnění tělesné hmotnosti. Výhodné sloučeniny agonistů amylinu projevují aktivitu v testu vazby receptorů řádově menší než přibližně 1 až 5 nM, výhodně menší než přibližně 1 nM a výhodněji menší než přibližně 50 pM. V testu na svaly *m. soleus* vykazují výhodné sloučeniny agonistů amylinu hodnoty EC_{50} řádově menší než přibližně 1 až 10 μ mol. V testech vyprazdňování žaludku vykazují výhodné sloučeniny agonistů hodnoty ED_{50} řádově menší než 100 μ g/potakana.

Amylin a peptidové agonisty amylinu je možno připravit s použitím standardních technik pro syntézu peptidů na pevné fázi, výhodně na automatizovaném nebo poloautomatizovaném syntetizátoru peptidů. Typicky jsou při použití těchto technik aminokyselina chráněná α -N-karbamoylovou skupinou a aminokyselina připojovaná k rostoucímu peptidovému řetězci navázaném na pryskyřici kondenzovány při teplotě místnosti v inertním rozpouštědle, jako je dimetylformamid, N-metylpiperidinon nebo metylenchlorid za přítomnosti kondenzačních činidel, jako jsou dicyklohexylkarbodiimid a 1-hydroxybenzotriazol v přítomnosti báze jako je diizopropyletylamin. Ochranná α -2N-karbamoylová skupina je odstraněna z výsledné peptid-pryskyřice s použitím činidla jako je trifluoroctová kyselina nebo piperidin a kondenzační reakce se opakuje s další požadovanou N-chráněnou aminokyselinou, která má být přidána k peptidovému řetězci. Vhodné N-ochranné skupiny jsou v oboru dobře známy, přičemž zde jsou výhodně užívány t-butyloxykarbonylová (tBoc) a fluorenylmetoxykarbonylová (Fmoc) skupina.

Rozpouštědla, deriváty aminokyselin a 4-metybenzhydrylaminovou pryskyřici používanou v syntetizátoru peptidů je možné zakoupit od firmy Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA). Od firmy Applied Biosystems Inc. je možné zakoupit

následující chráněné aminokyseliny s chráněným postranním řetězcem: Boc-Arg(Mts), Fmoc-Arg(Pmc), Boc-Thr(Bzl), Fmoc-Thr(t-Bu), Boc-Ser(Bzl), Fmoc-Ser(t-Bu), Boc-Tyr(BrZ), Fmoc-Tyr(t-Bu), Boc-Lys(Cl-Z), Fmoc-Lys(Boc), Boc-Glu(Bzl), Fmoc-Glu(t-Bu), Fmoc-His(Trt), Fmoc-Asn(Trt) a Fmoc-Gln(Trt). Boc-His(BOM) se může koupit od firmy Applied Biosystems Inc. nebo od Bachem Inc. (Torrance, CA). Anizol, metylsulfid, fenol, etandithiol a thioanizol je možné získat od firmy Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI). HF dodává firma Air Products and Chemicals (Allentown, PA). Etyléter, kyselina octová a metanol se mohou koupit od firmy Fisher Scientific /Pittsburgh, PA).

Syntéza peptidů na pevné fázi se může provádět na automatickém syntetizátoru peptidů (model 430A, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) s použitím systému NMP/HOBt (Volba 1) a chemického postupu s TboC nebo Fmoc (viz příručku uživatele od Applied Biosystems pro syntetizátor peptidů ABI 430A, verze 1.3B, 1. července, 1988, část 6, s. 49-70, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) s čepičkou ("capping"). Boc-peptidové pryskyřice se štěpí HF (-5 °C až 0 °C, 1 hodina). Peptid se extrahuje z pryskyřice střídáním vody a kyseliny octové a filtráty se lyofilizují. Fmoc-peptidová pryskyřice se štěpí podle standardních metod (Introduction to Cleavage Techniques, Applied Biosystems Inc., s. 6-12, 1990). Peptidy mohou být také kondenzovány při použití syntetizátoru Advanced Chem Tech Synthesizer (Model MPS 350, Louisville, Kentucky).

Peptidy jsou purifikovány pomocí RP-HPLC (preparativní a analytické) s použitím systému Waters Delta Prep 3000. Pro izolaci peptidů jsou použity preparativní kolony C4, C8 nebo C18 (10 μ, 2,2 x 25 cm, Vydac, Hesperia, CA) a čistota se určuje pomocí analytických kolon C4, C8 nebo C18

(5 μ , 0,46 x 25 cm, Vydac). Rozpouštědla (A=0,1% TFA/voda a B=0,1% TFA/CH₃CN) jsou nanášena na analytickou kolonu při průtoku 1,0 ml/min a na preparativní kolonu při průtoku 15 ml/min. Analýzy aminokyselin se provádějí na systému Waters Pico Tag a zpracovávají se s použitím programu Maxima. Peptidy jsou hydrolyzovány kyselou hydrolyzou v parní fázi (115 °C, 20-24 hodin). Hydrolyzáty jsou derivatizovány a analyzovány standardními metodami (Cohen et al., The Pico Tag Method: A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis, s. 11-52, Millipore Corporation, Milford, MA, 1989). Analýza ostřelováním rychlými atomy se provádí pomocí M-Scan, Incorporated (West Chester, PA). Hmotnostní kalibrace se provádí s použitím jodidu cesného nebo jodidu cesného/glycerolu. Plazmatická desorpční ionizační analýza používající čas letové detekce se prováděla na hmotnostním spektrometru Applied Biosystems Bio-Ion 20.

Peptidové sloučeniny použitelné ve vynálezu mohou být také připraveny technikami rekombinantní DNA, použitím metod v oboru nyní známých. (Viz např. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vydání, Cold Spring Harbor, 1989). Nepeptidové sloučeniny použitelné v předkládaném vynálezu se připravují metodami v oboru známými.

Sloučeniny uváděné výše mohou tvořit soli s různými anorganickými a organickými kyselinami a zásadami. Tyto soli zahrnují soli připravené s organickými a anorganickými kyselinami, jako je například HCl, HBr, H₂SO₄, H₃PO₄, kyselina trifluorooctová, kyselina octová, kyselina mravenčí, kyselina metansulfonová, kyselina toluensulfonová, kyselina maleinová, kyselina fumarová a kyselina kafrsulfonová. Soli připravené se zásadami zahrnují amonné soli, soli alkalických kovů, např. sodné a draselné soli, a soli alkalických zemin, např. vápenaté a hořečnaté soli. Výhodné jsou soli kyseliny octové,

chlorovodíkové a trifluoroctové. Soli kyseliny octové jsou nejvýhodnější. Soli se tvoří obvyklými prostředky, jako reakce volné kyseliny nebo zásady, kdy se tvoří produkt s jedním nebo více ekvivalenty příslušné zásady nebo kyseliny v rozpouštědle nebo médiu, ve kterém je sůl nerozpustná, nebo v rozpouštědle, jako je voda, které je pak odstraněno ve vakuu nebo lyofilizací nebo výměnou iontů existující soli za jiný ion na vhodné iontoměničové pryskyřici.

Přípravky použitelné podle předkládaného vynálezu mohou být příhodně poskytnuty v lékových formách vhodných pro parenterální podávání (včetně intravenózního, intramuskulárního a subkutánního) nebo pro nazální či perorální podávání. Nejlépe je vhodná forma podávání určena lékařem individuálně pro každého pacienta. Vyhovující farmaceuticky přijatelné nosiče a formulace přípravků jsou popsány ve standardních odborných publikacích o formulaci přípravků, např. Remington's Pharmaceutical Sciences od E.W. Martina. (Viz také Wang, Y.J. a Hanson, M.A., „Parental Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers“, Journal of Parental Science and Technology, Technical Report č. 10, Supp. 42, 2S, 1988). Sloučeniny formulované jako parenterální přípravky pro injekce nebo infúze mohu být například suspendovány v inertním oleji, vhodně v rostlinném oleji, jako je sezamový, podzemnicový, olivový olej nebo jiný přijatelný nosič. Výhodně jsou suspendovány ve vodném nosiči, například v izotonickém pufrovací roztoku s pH přibližně 5,6 až 7,4. Tyto přípravky jsou sterilizovány obvyklými sterilizačními technikami nebo jsou sterilizovány filtrací. Přípravky mohou obsahovat farmaceuticky přijatelné pomocné látky, jak je vyžadováno pro přiblížení se fyziologickému stavu, jako jsou činidla pufrující pH. Použitelné pufrы zahrnují například pufr acetát sodný/kyselina octová. Může

být použita forma zásobníkového nebo „depotního“ přípravku s pomalým uvolňováním, takže léčebně účinné množství přípravku se podává do krevního oběhu po mnoho hodin nebo dnů po transdermální injekci nebo podání.

Tyto parenterální lékové formy se výhodně připravují podle patentové přihlášky (v obecném vlastnictví) s názvem „Parenteral, Liquid Formulations for Amylin Agonist Peptides“, pořadové č. 60/035 140, podané 8. ledna 1997, a podle patentové přihlášky U.S. pořadové č. 09/005 262, podané 8. ledna 1998, na které se tímto odkazujeme: Parenterální lékové formy obsahují přibližně 0,01 až 0,5 % (hmotnost/objem) amylinu nebo agonisty amylinu ve vodném systému spolu s přibližně 0,02 až 0,5 % (hmotnost/objem) acetátového, fosfátového, citrátového nebo glutamátového pufru tak, aby se dosáhlo pH konečného přípravku přibližně 3,0 až 6,0 (výhodněji 3,0 až 5,5), a také přibližně 1,0 až 10 % (hmotnost/objem) sacharidu nebo polyhydričkého alkoholu jako tonizačního činidla ve vodné spojitě fázi. Ve výhodné formulaci produktu navrženého tak, aby bylo pacientovi umožněno odstranění častého dávkování, je také přítomno přibližně 0,005 až 1,0 % (hmotnost/objem) antimikrobiálního konzervačního prostředku vybraného ze skupiny skládající se z m-krezolu, benzylalkoholu, metyl-, etyl-, propyl- a butylparabenu a fenolu. Stabilizátor není nezbytný. Aby se získala požadovaná koncentrace roztoku, je použito postačující množství vody pro injekce. Je-li žádoucí, může být také přítomen chlorid sodný, a také další excipienty. Tyto excipienty ale musí udržovat celkovou stabilitu amylinu nebo peptidového agonisty amylinu. Tekuté přípravky jsou v podstatě izotonické, tj. v mezích ± 20 % izotonie a výhodně v mezích 10 % izotonie. Nejvýhodněji v přípravku amylinu nebo agonisty amylinu pro parenterální podávání polyhydričkový

alkohol je mannit, pufr je acetátový pufr, konzervační činidlo je přibližně 0,1 až 0,3 % (hmotnost/objem) m-krezolu a pH je přibližně 3,7 až 4,3. Požadované izotonie je dosaženo použitím chloridu sodného nebo jiné farmaceuticky přijatelné soli.

Je-li žádoucí, roztoky výše uvedených přípravků mohou být zahuštěny pomocí zahušťovadla, jako je metylcelulóza. Mohou být připraveny ve formě emulze, buď voda v oleji nebo olej ve vodě. Může být použit každý z celé řady farmaceuticky přijatelných emulgátorů včetně například arabské gumy, neionogenního surfaktantu (jako je Tween) nebo iontového surfaktantu (jako jsou sulfáty nebo sulfonáty alkalického polyéterového alkoholu, např. Triton).

Přípravky použitelné ve vynálezu jsou připraveny smísením složek podle obecně přijatých postupů. Například vybrané složky se jednoduše smísí v mixéru nebo jiném standardním zařízení za vzniku koncentrované směsi, která pak může být upravena na konečnou koncentraci a viskozitu přidáním vody nebo zahušťovadla a možná pufru ke kontrole pH nebo dalšího solutu ke kontrole tonicitu.

Pro používání lékařem jsou přípravky poskytnuty v jednotkových lékových formách obsahujících množství amylinu nebo agonisty amylinu, například sloučeniny analogu agonisty amylinu, která účinně v jedné nebo několika dávkách kontroluje obezitu na zvolené úrovni. Tarapeuticky účinné množství amylinu nebo agonisty amylinu, jako je analog agonisty amylinu pro použití kontroly obezity, je takové množství, které snižuje tělesnou hmotnost. Jak odborníci rozpoznávají, účinné množství léčebného přípravku se bude měnit v závislosti na mnoha faktorech včetně věku a hmotnosti pacienta, pacientova fyzického stavu, účinku, který má být dosažen, a dalších faktorech.

Účinné jednotlivé, rozdělené nebo kontinuální účinné dávky sloučenin, obsahujících například $^{25,28,29}\text{Pro-h-amylin}$, $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-amylin}$ a $^{18}\text{Arg}^{25,28}\text{Pro-h-amylin}$, jsou typicky v rozmezí přibližně 0,01 až přibližně 5 mg/den, výhodně přibližně 0,05 až 2 mg/den a výhodněji přibližně 0,1 až 1 mg/den, pro 70 kg pacienta, podávané v jednotlivé, rozdělené nebo kontinuální dávce. Přesná dávka, která bude podávána, je určena ošetřujícím lékařem a závisí na řadě faktorů včetně těch, které jsou uvedeny výše. Podávání by mělo začít při první známce obezity. Podávání může být injekcí nebo infúzí, výhodně intravenózní, subkutánní nebo intramuskulární. Perorálně aktivní sloučeniny se mohou brát ústy, ale dávky se zvýší 5 až 10 x.

Obecně v léčení nebo prevenci obezity jsou sloučeniny tohoto vynálezu podávány pacientům, kteří tuto léčbu potřebují, v rozmezí dávek podobnému rozmezí uvedenému výše, ale sloučeniny se mohou podávat častěji, například jednou, dvakrát nebo třikrát denně nebo kontinuálně. Výhodně jsou dávky peptidových agonistů, například pramlintidu, podávány subkutánně v dávce 30 až 300 g podávané jednou až čtyřikrát denně a výhodněji v dávkách 30 až 120 μg podávaných dvakrát až čtyřikrát denně.

Pro lepší porozumění předkládanému vynálezu jsou připojeny následující příklady, které popisují výsledky série pokusů. Studie týkající se tohoto vynálezu nelze v žádném případě považovat za omezení vynálezu. Varianty vynálezu, nyní neznámé a vyvinuté později, které jsou v kompetenci průměrného odborníka, spadají také do rámce předkládaného vynálezu, jak je zde popsán a definován v patentových nárocích.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Měření tělesné hmotnosti: 4-týdenní studie diabetiků typu 2, kteří potřebují inzulin

Účastníci studie byli muži a ženy ve věku od 25 do 78 let s anamnézou *diabetes mellitus* typu II vyžadující léčbu inzulinem alespoň 6 měsíců před testovací návštěvou. Tělesná hmotnost pacientů se nelišila více než o 45 % od žádoucí hmotnosti před přijetím do studie (na základě tabulek Metropolitan Life). Studie použila metody popsané v práci Thompson et al. (Diabetes, 46, 632-636, 1997). Po úvodním období s placebem byli pacienti randomizováni do skupin pro příjem placeba nebo jednoho ze tří dávkových režimů^{25,28,29} Proh-amylinu (pramlintidu) po dobu 4 týdnů: 30 µg QID (před snídaní, obědem, večeří a večerním zákuskem), 60 µg TID (před snídaní, obědem a večeří) nebo 60 µg QID (před snídaní, obědem, večeří a večerním zákuskem). Během lékového období studie si pacienti sami podávali čtyři injekce studovaného léčiva denně, během 15 minut před každým jídlem a večerním zákuskem. V období dvojité slepé studie dostávali pacienti randomizovaní na pramlintid 60 µg TID před večerním zákuskem placebo. Jak pramlintid, tak placebo byly podávány jako nezávislé injekce do subkutánní tkáně přední břišní stěny, specifické místo se měnilo po každé injekci. Pacienti byli instruováni, aby zůstali na své obvyklé dietě, inzulinu a pohybovém režimu v průběhu studie, dokud nebudou instruováni výzkumnými pracovníky jinak a aby před všemi klinickými návštěvami abstinovali od alkoholických nápojů.

Jak je ukázáno v tabulce I, nastala statisticky významná redukce hmotnosti proti výchozí hmotnosti v týdnu 4 ve skupinách s pramlintidem 60 µg TID (průměr = -0,89 kg, $p = 0,0056$) a pramlintidem 60 µg QID (průměr = -0,72 kg, $p = 0,0014$). S Hochbergovou korekcí pro vícenásobné srovnání nenastala žádná statisticky významná změna tělesné hmotnosti proti výchozí hmotnosti v týdnu 4 v žádné ze tří skupin s pramlintidem ve srovnání se skupinou s placebem. Podávání pramlintidu při nepřerušném užívání inzulínu tedy vylepšilo kontrolu glykémie se snížením tělesné hmotnosti, které dosáhlo statistické významnosti ve skupinách se 60 µg TID a QID. Toto snížení je v ostrém kontrastu s hmotnostním přírůstkem obvykle spojeným se zlepšenou kontrolou glukózy dosaženou samotným inzulínem u pacientů s diabetem typu 2.

Tabulka I

Tělesná hmotnost: změna od výchozí hmotnosti do týdnu 4

Skupina ošetřená:	Počet	Výchozí hmotnost	Změna v týdnu 4		Hodnota p^*	
		Průměr (kg)	Průměr (kg)	Medián (kg)	Ve skupině s léčivem	Srovnání s placebem
Placebo	47	87,0	-0,04	0,0	NV	NP
Pramlintid 30 µg QID	47	88,5	-0,36	-0,45	NV	NV
Pramlintid 60 µg TID	48	86,2	-0,89	-1,05	0,0056	NV
Pramlintid 60 µg QID	51	91,5	-0,72	-0,45	0,0014	NV

* Studentův t-test (srovnání ve skupinách s léčivem).
Dvourozměrná analýza ANOVA (srovnání s placebem)
s Hochbergovou korekcí.

NV = statisticky nevýznamné, NP = nepoužitelné

Příklad 2

Měření tělesné hmotnosti: 52 týdnů dlouhá studie s diabetiky typu 1

Tato studie byla multicentrická, dvojitě slepá, s kontrolním placebem a paralelními skupinami s potenciálním zvyšováním dávky. Účastníci studie byli muži a ženy ve věku od 16 do 70 let s diabetes mellitus typu 1. Pacienti si sami podávali čtyři subkutánní injekce s 30 µg pramlintidu nebo placebo denně, před každým jídlem a zákuskem před spaním. Určití pacienti (ti z těch, co brali pramlintid, kteří měli snížený HbA1c proti výchozí hodnotě méně než 1,0 % po 13 týdnech léčby) byli znovu randomizováni ve 20 týdnech na buď 30 µg nebo 60 µg QID pro zbytek studie. Pacienti v této studii bylo ošetřováni studovaným léčivem formulovaným na pH 4,0 v koncentraci umožňující injekci 0,1 ml na dávku. 477 pacientů dostalo alespoň jednu dávku studovaného léčiva (pramlintid nebo placebo). Ze 477 pacientů randomizovaných a pacientů, kterým bylo podáváno léčivo, 52 týdenní studii ukončilo 341.

Pacienti léčení pramlintidem prodělali klinicky a statisticky významné snížení tělesné hmotnosti ve srovnání s placebem, v době 13, 26 a 52 týdnů (tabulka II). Největší rozdíl proti placebo byl pozorován ve 26 a 52 týdnech (snížení alespoň 1,2 kg ve srovnání s placebem v každém časovém bodu). Ztráta hmotnosti nastala zejména u pacientů, kteří měli výchozí index tělesné hmotnosti (BMI) alespoň 27,0 kg/m², což ukazuje největší přínos u obézních pacientů (tabulka III).

Pacienti, kteří brali pramlintid v podskupině pacientů s výchozími hladinami HbA1c alespoň 8,0 % a stabilní dávkou

inzulínu, prodělali průměrné snížení tělesné hmotnosti ve srovnání s placebem ve všech třech časových bodech (tabulka IV). Toto pozorování je v souladu s dobře známým účinkem inzulínu napomáhat růstu tělesné hmotnosti. Zdá se tedy, že pramlintid snižuje nárůst tělesné hmotnosti indukovaný inzulinem.

Data vykazující normální rozložení byla analyzována použitím dvourozměrné analýzy variance. V případech, kdy bylo shledáno, že data nesledují normální rozložení, byly použity neparametrické metody (Kruskal-Wallisův test) založené na kategoriích. V těchto případech je uveden Hodges-Lehmanův estimační koeficient místo průměru.

Tabulka II

Tělesná hmotnost: změny proti výchozí hmotnosti
Hmotnosti v týdnech 13, 26 a 52

Časový bod/tělesná hmotnost (kg)	Placebo (n=154)	Pramlintid 30 nebo 60 µg QID (n=163)
Výchozí hmotnost		
Průměr (SE)	76,3 (1,1)	76,4 (1,1)
Medián	75,0	75,9
Rozmezí	47, 121,8	46,4, 113,6
Týden 13 (3 měsíce)		
Průměr (SE)	76,5 (1,1)	75,4 (1,1)
Medián	75,1	75,6
Rozmezí	45, 125,7	47,3, 110,5
Změna od výchozí hmotnosti		
Průměr (SE)	0,2 (0,2)	-1,0 (0,2)
Medián	0	-1,0
Rozmezí	-6,0, 8,2	-7,6, 8,2
Hodgesův-Lehmanův	-	-1,2

estimační koeficient
pro rozdíl proti
placebu

Hodnota p [†]	-	0,0001*
Týden 26 (6 měsíců)	76,9 (1,1)	75,5 (1,1)
Průměr (SE)	75,9	76,4
Medián	45,8, 126,8	46,4, 111,2
Rozmezí		
Změna od výchozí hmotnosti		
Průměr (SE)	0,6 (0,2)	-0,9 (0,3)
Medián	0,55	-0,5
Rozmezí	-7,3, 9,3	-23,5, 9,1
Hodgesův-Lehmanův estimační koeficient pro rozdíl proti placebu	-	-1,3
Hodnota p [†]	-	0,0001*
Týden 52 (12 měsíců)		
Průměr (SE)	77,1 (1,1)	76,0 (1,1)
Medián	75,7	76,4
Rozmezí	44,8, 126,8	48,2, 109,9
Změna od výchozí hmotnosti		
Průměr (SE)	0,8 (0,3)	-0,5 (0,3)
Medián	0,8	-0,5
Rozmezí	-11,5, 11,2	-12,0, 13,7
Průměrný rozdíl proti placebu	-	-1,3
Hodnota p [†]	-	0,0137*

† Kruskal-Wallisův test

‡ dvourozměrná ANOVA

* statisticky významný rozdíl ve srovnání s placebem

Tabulka III

Tělesná hmotnost: změny proti výchozí hmotnosti u pacientů s výchozí hmotností BMI $\geq 27,0$ kg/m² nebo $< 27,0$ kg/m²
Hmotnosti v týdnech 13, 26 a 52

Podskupina BMI/tělesná hmotnost (kg)	Placebo (n=154)	Pramlintid 30 nebo 60 µg QID (n=164)
Výchozí BMI $\geq 27,0$ kg/m ²		
Změna v týdnu 52		
Počet	51	53
Průměr (SE)	0,4 (0,53)	-1,8 (0,65)
Rozmezí	-6,4, 11,2	-12,0, 9,1
Výchozí BMI $< 27,0$ kg/m ²		
Změna v týdnu 52		
Počet	103	110
Průměr (SE)	1,0 (0,36)	0,1 (0,28)
Rozmezí	-11,5, 11,2	-5,0, 13,7

Tabulka IV

Tělesná hmotnost: změny proti výchozí hmotnosti
Pacienti s HbA_{1c} $\geq 8,0$ %, inzulín v ± 10 % od výchozí hmotnosti v týdnech 13, 26 a 52

Časový bod/tělesná hmotnost (kg)	Placebo (n=31)	Pramlintid 30 nebo 60 µg QID (n=39)
Výchozí hmotnost		
Průměr (SE)	75,9 (2,2)	81,3 (2,2)
Medián	74,6	79,4
Rozmezí	52,4, 113,6	55,5, 113,6
Týden 13 (3 měsíce)		
Průměr (SE)	75,8 (2,1)	80,3 (2,1)

Medián	74,1	78,6
Rozmezí	56,5, 108,2	56,4, 110,5
Změna od výchozí hmotnosti		
Průměr (SE)	-0,1 (0,4)	-1,0 (0,4)
Medián	0	-1,4
Rozmezí	-6,4, 4,1	-7,6, 8,2
Průměrný rozdíl proti placebo	-	-0,9
Hodnota p [†]	-	0,0745
Týden 26 (6 měsíců)	76,2 (2,0)	80,8 (2,1)
Průměr (SE)	75,9	80,5
Medián	54,9, 108,2	55,5, 111,2
Rozmezí		
Změna od výchozí hmotnosti		
Průměr (SE)	0,3 (0,5)	-0,5 (0,6)
Medián	0,4	0
Rozmezí	-5,4, 5,9	-10,5, 9,1
Průměrný rozdíl proti placebo	-	-0,8
Hodnota p [†]	-	0,1197
Týden 52 (12 měsíců)		
Průměr (SE)	76,5 (2,1)	81,7 (2,1)
Medián	75,9	79,6
Rozmezí	54,5, 109,1	56,4, 109,9
Změna od výchozí hmotnosti		
Průměr (SE)	0,6 (0,7)	0,4 (0,6)
Medián	0,7	0,2
Rozmezí	-7,0, 11,2	10,0, 13,7
Průměrný rozdíl proti placebo	-	-0,2
Hodnota p [†]	-	0,2441

† dvourozměrná ANOVA

* statisticky významný rozdíl ve srovnání s placebem

Příklad 3

Měření tělesné hmotnosti: 52 týdnů dlouhá studie s diabetiky typu 2, kteří potřebují inzulin

Tato studie byla multicentrická, dvojitě slepá, s kontrolním placebem a paralelními skupinami s dávkami v daném rozmezí. Účastníci studie byli muži a ženy ve věku od 18 do 75 let s diabetes mellitus typu 2, kteří potřebují inzulin. Pacienti si sami podávali tři subkutánní injekce pramlintidu (30, 75 nebo 150 μg TID) nebo placebo (TID) denně, před každým jídlem, po dobu 52 týdnů. Pacienti v této studii bylo ošetřováni studovaným léčivem formulovaným na pH 4,7 v koncentraci umožňující injekci 0,3 ml na dávku. Dvojité slepému období s léčbou předcházelo úvodní slepé období pouze s placebem dlouhé 3 až 10 dnů. Z 539 pacientů randomizovaných a pacientů, kterým bylo podáváno léčivo, 52 týdenní studii ukončilo 381.

Pacienti léčení každou ze tří dávek pramlintidu prodělali klinicky a statisticky významné snížení tělesné hmotnosti ve srovnání s placebem, v době 13, 26 a 52 týdnů (tabulka V). Největší rozdíl proti placebo byl pozorován ve 26 a 52 týdnech (snížení alespoň 2,3 a 2,7 kg ve srovnání s placebem v těchto časových bodech). Hmotnost pacientů ošetřovaných placebem se vzhledem k výchozí hmotnosti zvýšila ve všech třech časových bodech, na rozdíl od redukce hmotnosti u tří skupin s pramlintidem ve všech časových bodech. Ztráta hmotnosti nastala jak u pacientů, kteří měli výchozí index tělesné hmotnosti (BMI) alespoň 27,0 kg/m^2 , tak u pacientů, kteří měli výchozí BMI méně než 27,0 kg/m^2 (tabulka VI).

Pacienti ve všech třech skupinách s pramlintidem s výchozí hladinou HbA_{1c} alespoň 8,0% a se stabilní dávkou inzulínu prodělali snížení tělesné hmotnosti ve srovnání s placebem ve všech časových bodech (tabulka VII). Velikost reakce byla obvyklá u všech pacientů srovnatelná, což svědčí pro účinek nezávislý na změnách v dávce inzulínu.

Normálně distribuovaná data byla analyzována použitím dvourozměrné analýzy variance (s Hochbergovou korekcí pro Bonferroniho postup pro vícenásobné srovnání). V případech, kdy bylo shledáno, že data nesledují normální distribuci, byly použity neparametrické metody (Kruskal-Wallisův test) založené na kategoriích. V těchto případech je uveden Hodges-Lehmanův estimační koeficient místo průměru.

Tabulka V

Tělesná hmotnost: změny proti výchozí hmotnosti
Hmotnosti v týdnech 13, 26 a 52

Časový bod/tělesná hmotnost (kg)	Placebo (n=89)	Pramlintid 30 µg TID (n=86)	Pramlintid 75 µg TID (n=93)	Pramlintid 150 µg TID (n=77)
Výchozí hmotnost				
Průměr (SE)	90,6 (1,6)	90,3 (1,8)	93,2 (1,8)	94,3 (2,1)
Medián	90,3	89,15	92,3	95,7
Rozmezí	59,5, 130,9	60,0, 140,0	51,8, 165,0	57,3, 158,1
Týden 13 (3 měsíce)				
Průměr (SE)	91,3 (1,6)	89,8 (1,8)	92,5 (1,9)	92,7 (2,1)
Medián	90,0	89,3	92,3	92,3
Rozmezí	60,5, 132,9	57,7, 142,7	49,1, 166,8	56,4, 156,8
Změna od výchozí hmotností				
Průměr (SE)	0,6 (0,2)	-0,5 (0,3)	-0,6 (0,4)	-1,6 (0,3)
Medián	0,5	-0,7	-0,4	-1,4

Rozmezí	-6,9, 8,7	-7,7, 10,5	-23,4, 9,5	-9,5, 2,7
Hodgesův-Lehmanův estimační koeficient pro rozdíl proti placebu	-	-1,1	-0,9	-2,0
Hodnota p [†]	-	0,0006*	0,0066*	0,0001*
Týden 26 (6 měsíců)				
Průměr (SE)	91,5 (1,7)	89,7 (1,8)	92,3 (1,8)	92,6 (2,1)
Medián	90,5	89,1	92,3	92,3
Rozmezí	58,6, 133,0	55,9, 140,9	46,4, 162,5	58,2, 156,4
Změna od výchozí hmotnosti				
Průměr (SE)	0,8 (0,3)	-0,6 (0,3)	-0,9 (0,5)	-1,7 (0,3)
Medián	0,9	-0,45	0	-1,5
Rozmezí	-5,3, 8,3	-10,7, 11,4	-24,7, 9,0	-10,0, 3,2
Hodgesův-Lehmanův estimační koeficient pro rozdíl proti placebu	-	-1,3	-1,3	-2,3
Hodnota p [†]	-	0,0005*	0,0029*	0,0001*
Týden 52 (12 měsíců)				
Průměr (SE)	91,9 (1,7)	89,6 (1,9)	92,3 (1,9)	92,4 (2,1)
Medián	90,0	89,05	92,7	92,7
Rozmezí	60,5, 136,6	55,9, 147,3	46,6, 170,8	56,4, 158,2
Změna od výchozí hmotnosti				
Průměr (SE)	1,2 (0,4)	-0,6 (0,4)	-0,9 (0,5)	-1,9 (0,7)
Medián	0,9	-0,4	-0,3	-1,8
Rozmezí	-8,0, 20,5	-13,6, 11,9	-31,1, 10,0	-43,2, 7,3
Průměrný rozdíl proti placebu	-	-1,6	-1,4	-2,7
Hodnota p [†]	-	0,0009*	0,0106*	0,0001*

† Kruskal-Wallisův test s Hochbergovou korekcí pro vícenásobná srovnání proti placebu

* statisticky významný rozdíl ve srovnání s placebem

Tabulka VI

Tělesná hmotnost: změny proti výchozí hmotnosti u pacientů s výchozí hmotností BMI $\geq 27,0$ kg/m² nebo $< 27,0$ kg/m²
Hmotnosti v týdnech 13, 26 a 52

Podskupina BMI /tělesná hmotnost (kg)	Placebo (n=91)	Pramlintid 30 µg TID (n=88)	Pramlintid 75 µg TID (n=97)	Pramlintid 150 µg TID (n=80)
Výchozí BMI $\geq 27,0$ kg/m ²				
Změna v týdnu 52				
Počet	67	67	80	62
Průměr (SE)	0,7 (0,43)	-0,3 (0,52)	-0,7 (0,47)	-1,8 (0,80)
Rozmezí	-8,0, 10,0	-13,6, 11,9	-13,7, 10,0	-43,2, 7,3
Výchozí BMI $< 27,0$ kg/m ²				
Změna v týdnu 52				
Počet	24	21	17	18
Průměr (SE)	2,4 (1,08)	-0,7 (0,56)	-1,7 (2,07)	-1,9 (0,71)
Rozmezí	-3,4, 20,5	-4,7, 6,4	-31,1, 9,0	-7,2, 6,5

Tabulka VII

Tělesná hmotnost: změny proti výchozí hmotnosti

Pacienti s HbA_{1c} $\geq 8,0$ %, inzulin v ± 10 % od výchozí hmotnosti v týdnech 13, 26 a 52

Časový bod/tělesná hmotnost (kg)	Placebo (n=26)	Pramlintid 30 µg TID (n=20)	Pramlintid 75 µg TID (n=22)	Pramlintid 150 µg TID (n=18)
Výchozí hmotnost				
Průměr (SE)	84,3 (2,9)	92,7 (3,5)	93,3 (3,2)	99,8 (5,6)
Medián	82,15	89,75	90,9	98,9

Týden 13 (3 měsíce)

Průměr (SE)	84,3 (2,8)	92,5 (3,6)	93,3 (3,3)	98,3 (5,7)
Medián	81,5	88,85	91,6	97,4
Rozmezí	60,5, 112,3	65,9, 123,4	67,3, 121,8	57,7, 156,8
Změna od výchozí hmotnosti				
Průměr (SE)	0,0 (0,2)	-0,2 (0,5)	-0,0 (0,7)	-1,5 (0,4)
Medián	0,45	-0,55	0	-1,55
Rozmezí	-3,4, 1,9	-4,6, 6,4	-5,9, 6,4	-3,9, 2,7
Hodgesův-Lehmanův estimační koeficient pro rozdíl proti placebu	-	-0,5	-0,4	-1,9
Hodnota p [†]	-	0,2812	0,5827	0,0005*

Týden 26 (6 měsíců)

Průměr (SE)	84,8 (2,9)	92,4 (3,6)	93,1 (3,3)	98,1 (5,6)
Medián	83,15	89,75	91,8	97,5
Rozmezí	60,9, 117,5	64,1, 123,6	71,8, 121,1	58,9, 156,4
Změna od výchozí hmotnosti				
Průměr (SE)	0,5 (0,3)	-0,3 (0,5)	-0,1 (0,8)	-1,8 (0,5)
Medián	0,7	-0,45	0	-1,4
Rozmezí	-2,7, 4,7	-3,7, 4,1	-6,8, 7,3	-5,4, 2,0
Hodgesův-Lehmanův estimační koeficient pro rozdíl proti placebu	-	-0,8	-0,6	-2,2
Hodnota p [†]	-	0,8903	0,3616	0,0552

Týden 52 (12 měsíců)

Průměr (SE)	85,2 (2,9)	91,9 (3,5)	93,4 (3,1)	95,3 (5,5)
Medián	83,3	89,05	92,05	94,0
Rozmezí	60,9, 115,0	66,7, 122,7	70,0, 116,2	57,3, 158,2
Změna od výchozí hmotnosti				
Průměr (SE)	0,9 (0,7)	-0,8 (0,4)	0,1 (1,0)	-4,6 (2,3)
Medián	0,45	-0,65	0,7	-2,55
Rozmezí	-4,6, 14,3	-4,1, 3,2	-8,6, 10,0	-43,2, 2,3

Průměrný rozdíl proti placebo	-	-1,8	-0,8	-5,5
Hodnota $p^{\dagger}$	-	0,1837	0,2377	0,0069*

$\dagger$ Kruskal-Wallisův test s Hochbergovou korekcí pro vícenásobná srovnání proti placebo

$\dagger$ dvourozměrná ANOVA s Hochbergovou korekcí pro vícenásobná srovnání proti placebo

* statisticky významný rozdíl ve srovnání s placebem

Příklad 4

Příprava ^{25,28,29}Pro-h-amylinu

Syntéza na pevné fázi ^{25,28,29}Pro-h-amylinu se prováděla pomocí standardních metod pro syntézu peptidů s použitím metylbenzhydrylaminové vazebné pryskyřice a postranním řetězcem chráněným N³-Boc/benzylovou skupinou. Pryskyřice ^{2,7}-[disulfid]amylin-MBHA se získala ošetřením AcM-chráněných cysteinů trifluoroacetátem thallitým (III) v kyselině trifluorooctové. Poté, co bylo dosaženo cyklizace, byly pryskyřice a skupiny chránící postranní řetězce odštěpeny tekutým HF v přítomnosti dimetylsulfidu a anizolu. ^{25,28,29}Pro-h-amylin byl purifikován preparativní HPLC s reverzní fází. Analytickou HPLC a kapilární elektroforézou se zjistilo, že peptid je homogenní a struktura byla ověřena analýzou aminokyselin a sekvenční analýzou. Produkt měl požadovaný hmotnostní ion. Fab hmotnostní spektrum: $(M+H)^+ = 3,949$.

Příklad 5

Příprava $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-amylinu}$

Syntéza na pevné fázi $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-amylinu}$ se prováděla pomocí standardních metod pro syntézu peptidů s použitím metylbenzhydrylaminové vazebné pryskyřice a postranním řetězcem chráněným $\text{N}^{\alpha}\text{-Boc/benzylovou}$ skupinou. $^{2,7}\text{-[disulfid]amylin-MBHA-pryskyřice}$ se získala ošetřením Ac-m-chráněných cysteinů trifluoroacetátem thallitým (III) v kyselině trifluoroctové. Poté, co bylo dosaženo cyklizace, byly pryskyřice a skupiny chránící postranní řetězce odštěpeny tekutým HF v přítomnosti dimetylsulfidu a anizolu. $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-amylin}$ byl purifikován preparativní HPLC s reverzní fází. Analytickou HPLC a kapilární elektroforézou se zjistilo, že peptid je homogenní a struktura byla ověřena analýzou aminokyselin a sekvenční analýzou. Produkt měl požadovaný hmotnostní ion. Fab hmotnostní spektrum: $(\text{M}+\text{H})^+ = 3,971$.

Příklad 6

Příprava $^{18}\text{Arg}^{25,28}\text{Pro-h-amylinu}$

Syntéza na pevné fázi $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-amylinu}$ se prováděla pomocí standardních metod pro syntézu peptidů s použitím metylbenzhydrylaminové vazebné pryskyřice a postranním řetězcem chráněným skupinou $\text{N}^{\alpha}\text{-Boc/benzyl}$. $^{2,7}\text{-[disulfid]amylin-MBHA-pryskyřice}$ se získala ošetřením Ac-m-chráněných cysteinů trifluoroacetátem thallitým (III) v kyselině trifluoroctové. Poté, co bylo dosaženo cyklizace,

byly pryskyřice a skupiny chránící postranní řetězce odštěpeny tekutým HF v přítomnosti dimetylsulfidu a anizolu. $^{18}\text{Arg}^{25,28}\text{Pro-h-amylin}$ byl purifikován preparativní HPLC s reverzní fází. Analytickou HPLC a kapilární elektroforézou se zjistilo, že peptid je homogenní a struktura byla ověřena analýzou aminokyselin a sekvenční analýzou. Produkt měl požadovaný hmotnostní ion. Fab hmotnostní spektrum: $(\text{M}+\text{H})^+ = 3,959$.

Příklad 7

Test vazby receptorů

Hodnocení vazby sloučenin na receptory amylinu se provádělo následujícím způsobem. Potkaní amylin značený ^{125}I (Bolton Hunter značený v N-koncovém lysinu) byl zakoupen od firmy Amersham Corporation (Arlington Heights, IL). Specifické aktivity v době použití se pohybovaly v rozmezí od 1950 do 2000 Ci/mmol. Neznačené peptidy byly získány od firmy BACHEM Inc. (Torrance, CA) a od Peninsula Laboratories (Belmont, CA).

Samci laboratorního potkana kmene Sprague-Dawley (200 až 250 gramů) byli usmrceni dekapitací. Mozky byly přeneseny do chladného fyziologického roztoku pufovaného fosforečnanu (PBS). Od ventrálního povrchu se dělaly řezy rostrálně k hypotalamu, laterálně ohraničené *tractus olfactorius* a táhly se ve 45° úhlu mediálně od těchto traktů. Tato tkáň bazálního předního mozku, obsahující *nucleus accumbens* a sousední oblasti, se zvažila a homogenizovala v ledově chladném 20 mM pufru HEPES (20 mM kyselina HEPES, pH upravené na 7,4 s NaOH ve 23°C). Membrány se promyly třikrát

v čerstvém pufru pomocí stočení po dobu 15 minut ve 48000xg. Konečný pelet membrán byl resuspendován ve 20 mM pufru HEPES obsahujícím 0,2 mM fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF).

Aby se měřila vazba ^{125}I , membrány ze 4 mg původní vlhké hmotnosti tkáně se inkubovaly se ^{125}I -amylinem ve 12-16 pM ve 20 mM pufru HEPES obsahujícím 0,5 mg/ml bacitracinu, 0,5 mg/ml bovinního sérového albuminu a 0,2 mM PMSF. Roztoky se inkubovaly 60 minut ve 23 °C. Inkubace se ukončila filtrací přes filtry ze skleněných vláken GF/B (Whatman Inc., Clifton, NJ), které byly předem namočený po dobu 4 hodin do 0,3% polyetyleniminu, aby se snížila nespecifická vazba radioaktivně značených peptidů. Filtry byly bezprostředně před filtrací propláchnuty 5 ml chladného PBS a ihned po filtraci 15 ml chladného PBS. Filtry byly vyjmuty a radioaktivita byla vyhodnocena pomocí gamma-počítače s účinností 77 %. Kompetiční křivky byly naměřeny v přítomnosti 10^{-12} až 10^{-6} M testované sloučeniny a byly analyzovány pomocí počítače, a sice užitím nelineární regrese pro 4 parametrovou logistickou rovnici (program Inplot, GraphPAD Software, San Diego, Kalifornie).

V tomto testu se purifikovaný humánní amylin vázal na svůj receptor při naměřené IC_{50} přibližně 50 pM. Výsledky pro testované sloučeniny jsou uvedeny v tabulce VIII, která ukazuje, že každá ze sloučenin má významnou vazebnou aktivitu pro receptor.

Příklad 8

Test na svalu *musculus soleus*

Stanovení aktivity agonisty amylinu se provádělo testem na *m. soleus* následujícím způsobem. V pokusu byly užití samci potkanů kmene Harlan Sprague-Dawley o hmotnosti přibližně 200 g, aby se hmotnost odděleného *m. soleus* udržela nižší než 40 mg. Zvířata hladověla 4 hodiny před utrácením dekapitací. Z dolní končetiny byla odpreparována kůže a končetina byla špendlíky připevněna ke korkové podložce. Achilova šlacha byla přetata právě nad *os calcis* a *m. gastrocnemicus* byl odtažen od zadní části tibie. *M. soleus*, malý plochý sval dlouhý 15 až 20 mm a silný 0,5 mm, ležící na povrchu *m. gastrocnemicus* směrem ke kosti, byl obnažen a očištěn pomocí jemných nůžek a pinzety. *M. soleus* byl pak rozdělen na stejné části čepelí skalpelu předozadním směrem bříškem svalu, takže byly získány celkem 4 svalové proužky z každého zvířete. Po vyjmutí svalu ze zvířete byl po krátkou dobu sval uchován ve fyziologickém roztoku. Nebylo nutné, aby byl sval udržován napnutý, neboť bylo prokázáno, že to nemá žádný vliv na inkorporaci radioaktivně značené glukózy do glykogenu.

Svaly byly přeneseny do 50ml Erlenmeyerovy baňky obsahující 10 ml probublaného Krebs-Ringerova bikarbonátového pufru, který obsahoval (na 1 liter) 118,5 mmol (6,93 g) NaCl, 5,94 mmol (443 mg) KCl, 2,54 mmol (282 mg) CaCl₂, 1,19 mmol (143 mg) MgSO₄, 1,19 mmol (162 mg) KH₂PO₄, 25 mmol (2,1 g) NaHCO₃, 5,5 mmol (1 g) glukózy, rekombinantní humánní inzulin (Humulin-R, Eli Lilly, IN) a testovanou sloučeninu, jak je podrobněji uvedeno dále. Hodnota pH ověřená při 37 °C byla 7,1 až 7,4. Svalové proužky byly rozděleny do různých baněk tak, že 4 svalové proužky z jednoho zvířete byly rovnoměrně

přiřazeny do různých testů. Inkubační médium bylo jemně probubláváno karbogenem (95 % O₂, 5 % CO₂) při současném protřepávání v 37 °C v kmitající vodní lázni. Po půlhodinové "preinkubaci" bylo přidáno do každé banky 0,5 µCi U-¹⁴C-glukózy a inkubace pak pokračovala dalších 60 minut. Každý svalový proužek byl pak rychle vyjmut, osušen a zmražen v tekutém dusíku, zvážen a uložen pro následné stanovení ¹⁴C-glykogenu.

Stanovení ¹⁴C-glykogenu se provádělo v 7ml scintilační víálce. Každý vzorek zmrzlého svalu byl vložen do víálky a natráven v 1 ml 60% hydroxidu draselného v 70 °C při stálém třepání po 45 minut. Rozpuštěný glykogen byl pak precipitován přidáním 3 ml absolutního alkoholu a zchlazením přes noc na teplotu -20 °C. Supernatant pak byl jemně odsát, glykogen byl opláchnut etanolem, etanol byl odsát a precipitát byl usušen pod vakuem. Všechny etanol byl před měřením odpařen, aby se zabránilo zhášení při scintilačním měření. Glykogen se pak znovu rozpustil v 1 ml vody a 4 ml scintilačního roztoku a byl pak změřen na ¹⁴C.

Rychlost inkorporace glukózy do glykogenu (vyjádřená v µmol/g/hod) byla získána z hodnot specifické aktivity ¹⁴C-glukózy v 5,5mM glukóze v inkubační médiu a z celkového ¹⁴C v glykogenu extrahovaném ze svalu, získaných scintilačním měřením. Křivky závislosti odpovědi na dávce byly získány proložením dat 4 parametrovým logistickým modelem metodou nejmenších čtverců iterativním postupem (program ALLFIT, verze 2.7, NIH, MD) a z ní byly stanoveny hodnoty EC₅₀. Jelikož hodnoty EC₅₀ mají logaritmicko-normální rozložení, je uvedena ± střední chyba logaritmu. Párové srovnání bylo provedeno pomocí t-testu pomocí programu SYSTAT (Wilkinson, SYSTAT: the system for statistics, SYSTAT Inc., Evanston, IL, 1989).

Křivky závislosti odpovědi na dávce byly vyneseny pro svaly v médiu s 7,1 nM (1000 µU/ml) inzulinem a každou z testovaných sloučenin v konečné (nominální) koncentraci 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 a 1000 nM. Každý test obsahoval také vnitřní pozitivní kontroly obsahující potkaní amylin z jednoho vzorku amylinu uschovaného v lyofilizovaném stavu v -70 °C.

Humánní amylin je známý hyperglykemický peptid a naměřené hodnoty EC_{50} amylinových preparátů v testu s *m. soleus* jsou typicky v rozmezí 1 až 10 nM, ačkoliv některé komerční preparáty s čistotou nižší než 90 % mají vyšší EC_{50} díky přítomnosti kontaminujících příměsí, které snižují měřenou aktivitu. Výsledky pro testované sloučeniny jsou uvedeny v následující tabulce VIII.

Tabulka VIII

EC ₅₀ (nM) pro sval	Test vazby receptoru IC ₅₀ (pM)	Test na <i>m. soleus</i>
1) ²⁵ Pro ²⁶ Val ^{28,29} Pro-h-amylin	18,0	4,68
2) ^{2,7} cyklo-[² Asp, ⁷ Lys]-h-amylin	310,0	6,62
3) ²⁻³⁷ h-amylin	236,0	1,63
4) ¹ Ala-h-amylin	148,0	12,78
5) ¹ Ser-h-amylin	33,0	8,70
6) ^{25,28} Pro-h-amylin	26,0	13,20
7) des- ¹ Lys ^{25,28} Pro-h-amylin	85,0	7,70
8) ¹⁸ Arg ^{25,28} Pro-h-amylin	32,0	2,83
9) des- ¹ Lys ¹⁸ Arg ^{25,28} Pro-h-amylin	82,0	3,77
10) ¹⁸ Arg ^{25,28,29} Pro-h-amylin	21,0	1,25
11) des- ¹ Lys ¹⁸ Arg ^{25,28,29} Pro-h-amylin	21,0	1,86
12) ^{25,28,29} Pro-h-amylin	10,0	3,71
13) des- ¹ Lys ^{25,28,29} Pro-h-amylin	14,0	4,15

Příklad 9

Test vyprazdňování žaludku s fenolovou červení

Vyprazdňování žaludku bylo měřeno modifikovanou metodou (Plourde et al., Life Sci. 53: 857-862, 1993), kterou původně popsali Scarpignato et al. (Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 246: 286-295, 1980). Stručně shrnuto, potkanům při vědomí bylo podáno gastrickou sondou 1,5 ml bezbarvého gelu obsahujícího 1,5% metylcelulózu (M-0262, Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) a indikátorem 0,05% fenolovou červení. Dvacet minut po intubaci žaludku byly potkani anestetizováni 5% halotanem, žaludek byl zasvorkován v místě pylorického a spodního esofagálního svěrače cévní svorkou, vyjmut a otevřen do alkalického roztoku, který byl pak doplněn na konstantní objem. Obsah žaludku pak byl stanoven na základě intenzity fenolové červeně v alkalickém roztoku měřením absorbance při vlnové délce 560 nm. Ve většině experimentů byl žaludek čistý. V jiných experimentech byl obsah žaludku centrifugován, aby se roztok pro měření absorbance projasnil. Pokud zředěný obsah žaludku zůstal zakalený, spektrofotometrická absorbance způsobená fenolovou červení byla určena jako rozdíl v alkalickém a okyseleném rozpouštědle. V samostatném experimentu se 7 potkany byl jak žaludek tak tenké střevo vyjmuty a otevřeny do alkalického roztoku. Množství fenolové červeně, která byla získána z horní části gastrointestinálního traktu do 29 minut po nakrmění sondou byla $89 \pm 4\%$, barvivo, které se nevratně navázalo na lumen střev lze započítat pro vyrovnání. Pro kompenzaci této malé ztráty, procento obsahu žaludku zbylé po 20 minutách bylo vyjádřeno jako frakce celkového obsahu žaludku u kontrolní skupiny potkanů utracených bezprostředně

po krmení sondou v tomtéž experimentu. Procento zbývajícího obsahu žaludku = (absorbance ve 20 minutách)/(absorbance v čase 0). Křivka závislosti odpovědi na dávce pro vyprazdňování žaludku byla získána proložením dat 4parametrovým logistickým modelem metodou nejmenších čtverců iterativním postupem (program ALLFIT, verze 2.7, NIH, MD) a z ní byly stanoveny hodnoty EC_{50} . Jelikož hodnoty EC_{50} mají logaritmicko-normální rozložení, je uvedena $\pm$ střední chyba logaritmu. Párové srovnání bylo provedeno pomocí jednorozměrnou analýzou rozptylu vícenásobným srovnávacím testem Student-Jewman-Keulse pomocí programu Instat, verze 2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) na hladině významnosti $P < 0,05$.

Ve studii dávkové odpovědi byl potkaní amylin (Bachem, Torrance, CA) rozpuštěn v 0,15M solném roztoku a byl podáván jako 0,1ml subkutánní bolus v dávce 0, 0,01, 0,1, 1, 10 a 100 μ g 5 minut před podáním gelu gastrickou sondou potkanů kmene Harlan Spargue-Dawley (bez diabetu) hladovějícím 20 hodin a diabetickým potkanům BB hladovějícím 6 hodin. Pokud byly injekce amylinu podány 5 minut před sondou s indikátorem fenolovou červení, došlo k potlačení vyprazdňování žaludku závislém na dávce (data nejsou uvedena). Potlačení vyprazdňování žaludku bylo úplné u normálních potkanů HSD po podání 1 μ g amylinu a u diabetických potkanů po podání 10 μ g ($P = 0,22, 0,14$). Hodnota ED_{50} pro inhibici vyprazdňování žaludku byla 0,43 (0,60 nmol/kg) $\pm$ 0,19 log jednotek u normálních potkanů a 2,2 μ g (2,3 nmol/kg) $\pm$ 0,18 log jednotek u diabetických potkanů.

Příklad 10

Test vyprazdňování žaludku s glukózou značenou tritiem

Potkani Harlan Spargue-Dawley, bez hladovění a při vědomí, byly znehybněny uchycením za ocas, jehož špička byla umrtvena 2% lidokainem. Tritium v plazmě oddělené z krve odebrané z ocasu 0, 15, 30, 60, 90 a 120 minut po krmení gastrickou sondou bylo staňoveno na počítači beta impulzů. Potkanům byl jednu minutu před krmením sondou injikován subkutánně 1 ml solného roztoku obsahující 0, 0,1, 0,3, 1, 10 nebo 100 μg potkaního amylinu ($n = 8, 7, 5, 5, 5$ v témže pořadí). Po nakrmení preinjikovaných potkanů glukózou se značeným tritiem hladina tritia v plazmě stoupla rychle ($t_{1/2}$ přibližně 8 minut) k asymptotě a pak pomalu klesala. Subkutánní injekce amylinu snížila a/nebo zpozdila absorpci značka způsobem závislým na dávce. Aktivita tritia byla integrována za dobu 30 minut, aby se získala plocha pod křivkou, která se vynesla jako funkce dávky amylinu. Hodnota ED_{50} získaná proložením logistické funkce je 0,35 μg amylinu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití amylinu nebo agonisty amylinu pro výrobu léku k léčení nebo prevenci obezity u člověka.

2. Použití podle nároku 1, kdy agonista amylinu je analog agonisty amylinu.

3. Použití podle nároku 2, kdy analog agonisty amylinu je ^{25,28,29}Pro-h-amylin.

4. Použití podle nároku 1, kdy se amylin nebo agonista amylinu člověku podává subkutánně.

5. Použití podle nároku 1, kdy se amylin nebo agonista amylinu podává 1 x až 4 x denně.

6. Použití podle nároku 5, kdy se amylin nebo agonista amylinu podává v množství 30 µg v jedné dávce až 300 µg v jedné dávce.

7. Použití podle nároku 6, kdy se amylin nebo agonista amylinu podává třikrát denně v množství 60 µg na dávku.

8. Použití podle nároku 6, kdy se amylin nebo agonista amylinu podává čtyřikrát denně v množství 60 µg v jedné dávce.

9. Použití podle nároku 7 nebo 8, kdy se podává agonista amylinu.

10. Použití podle nároku 9, kdy agonista amylinu je^{25,28,29}Pro-h-amylin.

11. Použití amylinu nebo agonisty amylinu pro výrobu léku ke snížení přírůstku hmotnosti indukovaného inzulinem u člověka užívajícího inzulin.

12. Použití podle nároku 11, kdy se podává agonista amylinu.

13. Použití podle nároku 11, kdy agonista amylinu je^{25,28,29}Pro-h-amylin.

14. Použití podle nároku 11, kdy člověk trpí *diabetes mellitus*.

15. Použití podle nároku 14, kdy člověk trpí *diabetes mellitus* typu 1.