



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **324818**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 38/22 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19995996	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.06.05 PCT/US98/11753
(22)	Inng.dag	1999.12.06	(85)	Videreføringsdag	1999.12.06
(24)	Løpedag	1998.06.05	(30)	Prioritet	1997.06.06, US, 870762
(41)	Alm.tilgj	2000.02.07			
(45)	Meddelt	2007.12.10			
(73)	Innehaver	Amylin Pharmaceuticals Inc, 9360 Towne Centre Drive, Suite 110, CA92121 SAN DIEGO, US			
(72)	Oppfinner	Orville G. Kolterman, Poway, CA, US Bradford J. Duft, Rancho Santa Fe, CA, US			
(74)	Fullmektig	JK Thorsens Patentbureau AS, Postboks 9276 Grønland, 0134 OSLO			

(54)	Benevnelse	Anvendelse av amylin eller en amylinagonist
(56)	Anførte publikasjoner	Can. J. Physiol. Pharmacol. 73: 1042-1046 (1995) J. Clin. Pharmacol 1997;37:453-473 Peptides, Vol. 12, side 865-869, 1991 US 5175145, US 5739106, WO 9640196, WO9726321
(57)	Sammendrag	

Fremgangsmåter for behandling av fedme omfattende administrering av en terapeutisk effektiv mengde av et amylin eller en amylinagonist alene eller sammen med annet fedme hjelpemiddel. Fremgangsmåte for å redusere insulinindusert vektøkning omfattende administrering av en terapeutisk effektiv mengde av et amylin eller en amylinagonist.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av et amylin eller en amylinagonist for fremstilling av et medisinsk middel for å redusere kroppsvekt hos et menneske.

5 **Amylin**

Strukturen og biologien til amylin er omtalt tidligere. Se f.eks. Rink et al., Trends in Pharmaceutical Sciences, 14:113-118 (1993); Gaeta og Rink, Med. Chem. Res., 3:483-490 (1994); og Pittner et al., J. Cell Biochem., 55S:19-28
10 (1994). Amylin er et 37 aminosyreprotein-hormon. Det ble isolert, rensset og kjemisk karakterisert som hovedkomponenten i amyloid-avsetninger i pankreasøyne hos avdøde "human Type 2" diabetikere (Cooper et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8628-8632 (1987)). Amylinmolekylet har to viktige post-
15 translasjonsmodifikasjoner: C-terminusen er amidert (dvs. den 37. aminosyrerest er tyrosinamid), og cysteinene i posisjoner 2 og 7 er tverrbundne til å danne en N-terminal sløyfe (via en cysteinrest). Sekvensen til den åpne leseramme av det humane amylingenet viser tilstedeværelse av Lys-Arg dibasisk
20 aminosyre-proteolytisk spaltesignal før det N-terminale kodon for Lys, og Gly før det Lys-Arg proteolytiske signal i C-terminal stillingen, en typisk sekvens for amidering ved hjelp av proteinamideringensenzym, PAM (Cooper et al., Biochem. Biophys. Acta, 1014:247-258 (1989)). Amylin er beskrevet og
25 omtalt i US patent nr. 5 367 052, utstedt 22. november 1994.

I type 1 diabetes er amylin blitt vist til å være mangelfull og kombinert erstatning med insulin er blitt foreslått som en foretrukket behandling i forhold til insulin alene i alle
30 former av diabetes. Bruk av amylin og andre amylinagonister for behandlingen av diabetes mellitus er formålet med US patent nr. 5 175 145, utstedt 29. desember 1992.

Farmasøytiske preparater som inneholder amylin og amylin pluss insulin er beskrevet i US patent nr. 5 124 314, utstedt
35 23. juni 1992.

For stor amylinvirkning sies å etterligne nøkkeltrekk for type 2 diabetes og amylinblokkade er blitt foreslått som en ny terapeutisk strategi. I US patent nr. 5 266 561, utstedt

30. november 1993, er det angitt at amylin bevirker reduksjon i både basal og insulin-stimulerte innlemmelse av merket glukose i glykogen i skjelettmuskel. Den sistnevnte effekt ble også angitt til å være delt med kalsitoningens-relatert peptid (CGRP) (se også Leighton og Cooper, Nature, 335:632-5 635 (1988)). Amylin er også rapportert til å redusere insulinstimulert opptak av glukose i skjelettmuskel og redusere glykogeninnhold (Young et al., Amer. J. Physiol., 259:45746-1 (1990)). Behandlingen av type 2 diabetes og 10 insulinresistens med amylinantagonister er omtalt.

Amylinsekvensen er omtrent 50% homolog med CGRP'ene, som også er 37 aminosyre-proteiner som er alminnelig utbredte neurotransmittere med en rekke potente biologiske virkninger, 15 inkluderende vasodilatasjon. Amylin og CGRP deler ²Cys-⁷Cys-disulfidbroen og en C-terminal aminosyre-amidrest, som begge er essensielle for fullstendig biologisk aktivitet (Cooper et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 857763-7766 (1988)). Amylin kan være et medlem av en familie av relaterte peptider som 20 inkluderer CGRP, insulin, insulinlignende vekstfaktorer og relaxiner og som deler felles genetisk arv (Cooper et al., Prog. Growth Factor Research, 1:99-105 (1989)).

Amylin syntetiseres primært i pankreas-betaceller og 25 utskilles som svar på næringsstimuli slik som glukose og arginin. Studier med klonende betacelle-tumorlinjer (Moore et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 179(1) (1991)), har vist at nærings-sekresjonsstimuli som glukose og arginin stimulerer frigivelse av amylin såvel som insulin. Det 30 molare amylin:insulinforhold av de utskilte proteiner varierer mellom preparater fra omtrent 0,01 til 0,4, men synes ikke å variere mye med akutte stimuli i noe enkelt preparat. Under forlenget stimulering med økt glukose kan imidlertid amylin:insulinforholdet øke progressivt (Gedulin 35 et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 180(1):782-789 (1991)). Amylin og insulin utskilles således ikke alltid i et konstant forhold.

Man har funnet og rapportert at visse virkninger av amylin er lignende enkelte ikke-metabolske virkninger av CGRP og kalsitonin, men de metabolske virkninger av amylin som ble oppdaget i forbindelse med undersøkelser av dette nylig
5 identifiserte protein synes imidlertid å reflektere dets primære biologiske rolle. I det minste noen av disse metabolske virkninger er etterlignet med CGRP, skjønt i doser som er markert vasodilatoriske (se f.eks. Leighton et al. Nature, 335:632-635 (1988); Molina et al., Diabetes,
10 39:260-265 (1990)).

Den første oppdagede virkning av amylin var reduksjonen av insulinstimulert innlemmelse av glukose i glykogen i rotteskjelettmuskel (Leighton et al. Nature, 335:632-635
15 (1988)), idet muskelen ble gjort "insulin-resistent". Senere arbeid med rotte-soleusmuskel ex-vivo og in vitro har indikert at amylin reduserer glykogensyntaseaktivitet, fremmer omdannelse av glykogenfosforylase fra inaktiv b form til aktiv a form, fremmer netto tap av glykogen (i nærvær
20 eller fravær av insulin), øker glukose-6-fosfatnivåer og kan øke laktatproduksjon (se f.eks. Deems et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 181(1):116-120 (1991); Young et al., FEBS Letts., 281(1,2):149-151 (1991)). Amylin synes ikke å påvirke glukosetransport per se (f.eks. Pittner et al., FEBS
25 Letts., 365(1):98-100 (1995)). Studier av amylin og insulin dose-respons sammenhenger viser at amylin virker som en ikke-konkurrerende eller funksjonell antagonist av insulin i skjelettmuskel (Young et al., Am. J. Physiol., 263(2):E274-E281 (1992)). Der er ingen bevis for at amylin interfererer
30 med insulinbinding til dets reseptorer, eller den påfølgende aktivering av insulinreseptor-tyrosinkinase (Follett et al., Clinical Research, 39(1):39A (1991)); Koopmans et al., Diabetologia, 34:218-224 (1991)).

35 Det menes at amylin virker gjennom reseptorer tilstede i plasmamembraner. Studier av amylin og CGRP, og effekten av selektive antagonister foreslår at amylin virker via dets egen reseptor (Beaumont et al., Br. J. Pharmacol., 115(5):713-715 (1995); Wang et al., FEBS Letts., 219:195-198

(1991 b)), i motsetning til konklusjonen fra andre arbeid om at amylin primært kan virke i CGRP reseptorer (f.eks. 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)). Amylinreseptorer og deres anvendelse i metoder for å screene og analysere med hensyn til amylinagonist og antagonistforbindelser er beskrevet i US patent nr. 5,264,372, utstedt 23. november, 1993.

10

Mens amylin har markerte virkninger på leverforbrenningsmetabolisme in vivo, er der ingen generell enighet med hensyn til hvilke amylinvirkninger som ses i isolerte hepatocytter eller gjennomspytt lever. De tilgjengelige data understøtter ikke ideen om at amylin fremmer hepatisk glykogenolyse, dvs. det virker ikke som glukagon (f.eks. Stephens et al., *Diabetes*, 40:395-400 (1991); Gomez-Foix et al., *Biochem J.*, 276:607-610 (1991)). Det er blitt foreslått at amylin kan virke på leveren for å fremme omdannelse av laktat til glykogen og for å øke mengden glukose som kan frigis ved glukagon (se Roden et al., *Diabetologia*, 35:116-120 (1992)). På denne måte kan amylin virke som en anabolsk partner til insulin i lever, i motsetning til dets katabolske virkning i muskel.

I fettceller, i motsetning til dets virkning i muskel, har amylin ingen påvisbar virkning på insulinstimulert glukoseopptak, innlemmelse av glukose i triglyserid, CO₂ produksjon (Cooper et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:7763-7766 (1988)) epinefrin-stimulert lipolyse eller insulininhibering av lipolyse (Lupien og Young, "Diabetes Nutrition and Metabolism - Clinical and Experimental," Vol. 6(1), side 1318 (februar 1993)). Amylin utviser således vevspesifikke effekter, med direkte virkning på skjelettmuskel, markerte indirekte (via substrattilførsel) og kanskje direkte effekter på lever, mens adipocytter synes å være "blinde" overfor tilstedeværelse eller fravær av amylin.

35

Det har også blitt rapportert at amylin kan ha markerte effekter på insulinsekresjon. Forsøk i intakt rotte (Young

et al., Mol. Cell. Endocrinol., 84:R1-R5 (1992)) indikerer at amylin inhiberer insulinsekresjon. Andre forskere har imidlertid ikke kunnet detektere effekter av amylin på isolerte β -celler, på isolerte øyer eller i hele dyret (se
5 Broderick et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 177:932-938 (1991)).

Amylin eller amylinagonister inhiberer sterkt gastrisk tømming i rotter (Young et al. Diabetologia 38(6):642-648
10 (1995)), hunder (Brown et al., Diabetes 43(Suppl 1):172A (1994)) og mennesker (Macdonald et al. Diabetologia 38(Suppl 1):A32 (abstract 118) (1995)). Gastrisk tømming er rapportert til å være akselerert i amylin-manglende type 1 diabetiske BB rotter (Young et al., Diabetologia, supra;
15 Nowak et al., J. Lab. Clin. Med., 123(1):110-6 (1994)) og i rotter behandlet med den selektive amylinantagonist, AC187 (Gedulin et al., Diabetologia, 38(Suppl 1):A244 (1995)). Effekten av amylin på gastrisk tømming synes å være fysiologisk (operativ ved konsentrasjoner som normalt
20 sirkulerer).

Ikke-metabolske virkninger av amylin inkluderer vasodilator-effekter som kan medieres ved interaksjon med CGRP vaskulære reseptorer. Rapporterte in vivo tester foreslår at amylin er
25 minst omtrent 100 til 1 000 ganger mindre potent enn CGRP som en vasodilator (Brain et al., Eur. J. Pharmacol., 183:2221 (1990); Wang et al., FEBS Letts., 291:195-198 (1991)). Effektene av amylin på regionale hemodynamiske virkninger, inkludert renal blodstrøm, i bevisste rotter er blitt
30 rapportert (Gardiner et al., Diabetes, 40:948-951 (1991)). Andre forfattere konstaterte at infusjon av rotteamylin var forbundet med større renal vasodilatasjon og mindre mesenterisk vasokonstriksjon enn det som ses med infusjon av human α -CGRP. De konkluderte med at, ved å fremme renal
35 hyperemi i større grad enn α -CGRP, kunne rotteamylin bevirke mindre markert stimulering av renin-angiotensinsystemet, og således mindre sekundær angiotensin II-mediert vasokonstriksjon. Det ble også bemerket at under koinfusjon av human α -⁸⁻³⁷CGRP rotteamylin, var imidlertid renale og

mesenteriske vasokonstriksjoner demaskert, antagelig på grunn av vasokonstriktoreffekter av angiotensin II uten motstand, og at dette funn er lignende det som man ser under koinfusjon av human A-CGRP og human α -⁸⁻³⁷CGRP (id. ved 951).

5

Amylin er også blitt rapportert til å ha effekter både på isolerte osteoklaster hvor det bevirket celleaktivitet, og in vivo hvor det ble rapportert til å nedsette plasma-kalsium med opp til 20% i rotter, i kaniner og i mennesker med

10 Paget's sykdom (se f.eks. Zaidi et al., Trends in Endocrinal. og Metab., 4:255-259 (1993)). Fra de tilgjengelige data, synes amylin å være 10 til 30 ganger mindre potent enn human kalsitonin for disse virkninger. Det ble rapportert at amylin synes å øke osteoklast cAMP produksjon men ikke øke cytosolisk Ca²⁺, mens kalsitonin gjør begge deler
15 (Alam et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 179(1):134-139 (1991)). Det ble foreslått, skjønt ikke etablert, at kalsitonin kan virke via to reseptortyper og at amylin kan intereagere med en av disse.

20

Det har også blitt funnet, overraskende sett på bakgrunn av dets tidligere beskrevne renale vasodialtor- andre egenskaper, at amylin markert øker plasmareninaktivitet i intakte rotter når gitt subkutant på en måte som unngår noen
25 innvirkning på blodtrykk. Dette sistnevnte punkt er viktig fordi nedsatt blodtrykk er et sterkt stimuli for renin frigivelse. Amylinantagonister, slik som amylinreseptor-antagonister, inkluderende dem som er selektive for amylinreseptorer sammenlignet med CGRP og/eller kalsitonin-
30 reseptorer, kan anvendes til å blokkere den amylin-fremkalte økning i plasmareninaktivitet. Bruk av amylinantagonister for å behandle reninrelaterte sykdommer er beskrevet i US patent nr. 5 376 638, utstedt 27. desember 1994.

35 I normale mennesker er fastende amylinnivåer fra 1 til 10 pM og post-prandiale eller post-glukose nivåer fra 5 til 20 pM blitt rapportert (f.eks. Koda et al., The Lancet, 339:1179-1180 (1992)). I overvektige, insulinresistente individer, kan amylinnivåer etter næringsinntak gå høyere, og nå opp til

omtrent 50 pM. For sammenligning, er verdier for fastende og post-prandial insulin fra henholdsvis 20 til 50 pM og 100 til 300 pM i friske individer, med kanskje 3 til 4 ganger høyere nivåer i insulin-resistente individer. Ved type 1 diabetes hvor betaceller er ødelagt, er amylinnivåer på eller under deteksjonsnivåene og stiger ikke som svar på glukose (Koda et al., *The Lancet*, 339:1179-1180 (1992)). I normale mus og rotter, er basalamylinnivåer blitt rapportert på fra 30 til 100 pM, mens verdier opp til 600 pM har blitt målt i visse insulinresistente diabetiske stammer av gnagere (f.eks. Huang et al., *Hypertension*, 19:I-101-I-109 (1991)).

Ved injeksjon inn i hjernen eller ved perifer administrering er amylin blitt rapportert til å undertrykke næringsinntak, f.eks. Chance et al., *Brain Res.*, 539:352-354 (1991) og Chance et al., *Brain Res.*, 607:185-188 (1993), en virkning som deles med CGRP og kalsitonin. De effektive konsentrasjoner i celler som medierer denne virkning er ikke kjent. Bruk av amylin og amylinagonister for behandling av anoreksi er beskrevet i US patent nr. 5 656 590, utstedt 12. august 1997. Preparater som inkluderer en cholecystokininagonist og en amylinagonist eller et hybridmolekyl for anvendelse ved reduksjon av næringsinntak eller for å kontrollere appetitt eller kroppsvekt er omtalt i US patent nr. 7 739 106, utstedt 14. april 1998.

Det vises også til *Peptides*, Vol, 12, side 865-869, 1991 og *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 1042-1046 (1995).

Fedme (obesitas) er en kronisk sykdom som er alminnelig utbredt i det moderne samfunn og er ikke bare forbundet med en sosial stigma, men også med nedsatt levetid og en rekke medisinske problemer som inkluderer uheldig psykologisk utvikling, reproduktive lidelser som polycystisk ovariesykdom, dermatologiske lidelser som infeksjoner, varikosevener, acanthosis nigricans, og eksem, treningsintoleranse, diabetes mellitus, insulinresistens, hypertensjon, hyperkolesterolemi, kolelitiase, osteoartritt, ortopedisk skade, tromboembolismesykdom, cancer og koronar

hjertesykdom. Rissanen et al., British Medical Journal, 301:835-837 (1990).

Fedme og særlig fedme i den øvre del av kroppen, er et vanlig
5 og svært alvorlig helseproblem i USA og over hele verden. I
henhold til de seneste statistikker, er mer enn 25% av
befolkningen i De Forente Stater og 27% av befolkningen i
Canada overvektige. Kuczmarski, Amer. J. of Clin. Nut.
55:495S-502S (1992); Reeder et al., Can. Med. Ass. J.,
10 23:226-233 (1992). Fedme på overkroppen er den største
risikofaktor som er kjent for type II diabetes mellitus, og
er likeledes en sterk risikofaktor med hensyn til kardio-
vaskulær sykdom og cancer. Nylige estimater i forbindelse
med medisinske omkostninger ved fedme er \$150 000 000 000
15 globalt. Problemet er blitt alvorlig nok til at den
generelle lege har begynt et initiativ for å bekjempe den
stadig økende fedme som florerer i det amerikanske samfunn.

Mye av denne fedmeindusert patologi kan skyldes den sterke
20 assosiasjon med dyslipidemi, hypertensjon og insulin-
resistens. En rekke undersøkelser har vist at reduksjon i
fedme med diett og mosjon nedsetter disse risikofaktorer
dramatisk. Dessverre er disse behandlinger svært lite
vellykkede med en feilandel som nærmer seg 95%. Dette
25 uheldige utfall kan skyldes det faktum at tilstanden er
sterkt forbundet med genetisk arvede faktorer som bidrar til
å øke appetitt, særlig for svært kaloririke næringsstoffer,
nedsatt fysisk aktivitet og økt lipogen metabolisme. Dette
indikerer at mennesker som arver disse genetiske egenskaper
30 er tilbøyelige til å bli fete uavhengig av deres forsøk på å
bekjempe tilstanden. Et nytt farmakologisk middel som derfor
kan korrigere dette fedmehandicap og bevirke til at legen
vellykket kan behandle fedmepasienter til tross for deres
genetiske arv behøves.

35

Eksisterende terapier for fedme inkluderer standart dietter
og mosjon, dietter med lavt kaloriinnhold, adferdsterapi,
farmakoterapi som involverer appetittsuppresjonsmidler,
termogeniske legemidler, næringsabsorpsjonsinhibitorer,

mekaniske innretninger slik som kjeveinstallasjon, livreimer ("waist cords") og ballonger, og kirurgisk inngrep. Jung og Chong, *Clinical Endocrinology*, 35: 11-20 (1991); Bray, *Am. J. Clin. Nutr.*, 55: 538S-544S (1992). Protein-skånende

5 modifisert fasting har blitt rapportert til å være effektiv for vektreduksjon i voksne. Lee et al., *Clin. Pediatr.*, 31: 234-236 (april 1992). Kaloribegrensning som en behandling for fedme fører til katabolisme av kroppsproteinlagre og produserer negativ nitrogenbalanse. Proteinsupplerte dietter

10 har derfor oppnådd popularitet som et middel til å nedsette nitrogentap under kaloribegrensning. Fordi slike dietter kun bevirker beskjeden nitrogensparing, behøver man en mere effektiv måte med hensyn til å beholde en mager kroppsmasse og proteinlagere. I tillegg vil behandling av fedme

15 forbedres dersom en slik kur også resulterer i et akselerert tap av kroppsfett. Forskjellige metoder med hensyn til slik behandling inkluderer dem som er diskutert av Weintraub og Bray, *Med. Clinics N. Amer.*, 73:237 (1989); Bray, *Nutrition Reviews*, 49:33 (1991).

20 I betraktning av den høye utbredelse av fedme i vårt samfunn og de alvorlige konsekvenser som er forbundet dermed som omtalt i det foregående, vil et hvilket som helst terapeutisk legemiddel som eventuelt er anvendbart for å redusere vekt

25 hos personer med fedme kunne ha en omfattende fordelaktig effekt på deres helse. Der er et behov for et legemiddel som reduserer den totale kroppsvekt hos individer med fedme mot deres ideelle kroppsvekt og hjelper med å opprettholde det reduserte vektnivå.

30 Man har nå overraskende funnet at amylin og amylinagonister, f.eks. amylinagonistanalogen ^{25,28,29}Pro-h-amylin (også omtalt som "pramlintid" og tidligere omtalt som "AC-0137"), kan anvendes for behandling av fedme i mennesker.

35 Amylinet eller amylinagonisten kan administreres alene eller sammen med et annet hjelpemiddel mot fedme. Med "behandling" menes styring og pleie av en pasient for det formål å bekjempe sykdommen, tilstanden eller lidelsen, og inkluderer

administrering av et amylin eller en amylinagonist for å forhindre inntreden av symptomer eller komplikasjoner, for å lindre symptomer eller komplikasjoner eller for å eliminere sykdomstilstanden eller lidelsen. Behandling av fedme inkluderer derfor inhibering av vektøkning og induksjon av vekttap hos pasienter med behov derfor. I tillegg er behandling av fedme ment til å inkludere vektkontroll for kosmetiske formål i mennesker, dvs. for å kontrollere kroppsvekten for å forbedre det kroppslige utseende.

10

Betegnelsen "amylin" skal forstås til å inkludere forbindelser slik som dem definert i US patent nr. 5 234 906, utstedt 10. august 1993, for "Hyperglycemic Compositions". Det inkluderer f.eks. humant peptidhormon omtalt som amylin og utskilt fra betaceller i pankreas, og artsvariasjoner derav. "Amylinagonist" er også en betegnelse som er kjent innen teknikkens stand, og refererer til en forbindelse som etterligner amylineffekter. En amylinagonist kan være et peptid eller en ikke-peptid forbindelse og inkluderer amylinagonistanaloger.

20

Betegnelsen "amylinagonistanalog" skal forstås til å referere til derivater av et amylin som virker som amylinagonister, normalt, som for tiden antatt, i kraft av binding til eller på annen måte direkte eller indirekte interaksjon med en amylinreseptor eller annen reseptor eller reseptorer med hvilke amylin selv kan interagere for å utløse en biologisk respons. Anvendbare amylinagonistanaloger inkluderer dem som er identifisert i en internasjonal patentsøknad, WPI Acc. nr. 93-182488/22 med tittelen "New Amylin Agonist Peptides Used for Treatment and Prevention of Hypoglycemia and Diabetes Mellitus".

30

Den foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av amylin eller en amylinagonist for fremstilling av et medisinsk middel for å redusere kroppsvekt hos et menneske, hvor nevnte medisinske middel er formulert til å avlevere en dose på omtrent 0,01 mg pr. døgn til omtrent 5 mg pr. døgn.

35

I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er amylinagonisten en amylinagonistanalog, foretrukket ^{25,28,29}Pro-h-amylin. ^{25,28,29}Pro-h-amylin og andre amylinagonistanaloger er beskrevet og angitt i US patent nr. 5 686 411, utstedt 11. november 1997.

Insulinindusert vektøkning i mennesker som tar insulin kan reduseres ved administrering av en terapeutisk effektiv mengde av et amylin eller en amylinagonist, foretrukket ^{25,28,29}Pro-h-amylin. Individet kan ha diabetes mellitus, f.eks. type 1 eller type 2 diabetes mellitus.

Det studium som er beskrevet i eksempel 1 viste at administrering av amylinagonisten ^{25,28,29}Pro-h-amylin (pramlintid) til insulin-brukende diabetikere (type 2) resulterte i et fall i kroppsvekt etter 4 uker som oppnådde statistisk signifikans i to doseringsgrupper, 60 µg TID og 60 µg QID. Studiet beskrevet i eksempel 2 viste at administrering av pramlintid (30 µg eller 60 µg QID) til type 1 diabetes resulterte i et statistisk signifikant fall i kroppsvekt, sammenlignet med placebo, etter 13, 26 og 52 uker. Studiet beskrevet i eksempel 3 viste at administrering av pramlintid (30, 75 eller 150 µg TID) til pasienter med type 2 diabetes som krever insulin resulterte i et statistisk signifikant fall i kroppsvekt, sammenlignet med placebo, etter 13, 26 og 52 uker. Disse resultater er i skarp kontrast til behandling med insulin alene hos pasienter med type 1 eller type 2 diabetes som vanligvis er forbundet med vektøkning.

Amylinagonistanaloger som er anvendbare i forbindelse med den foreliggende oppfinnelse inkluderer amylinagonistanaloger som beskrevet og angitt i ovennevnte US patent nr. 5 686 411. Amylinagonister inkluderer agonistanaloger av amylin som følger:

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

hvor

- A_1 er Lys, Ala, Ser eller hydrogen,
 B_1 er Ala, Ser eller Thr,
 C_1 er Val, Leu eller Ile,
 5 D_1 er His eller Arg,
 E_1 er Ser eller Thr,
 F_1 er Ser, Thr, Gln eller Asn,
 G_1 er Asn, Gln eller His,
 H_1 er Phe, Leu eller Tyr,
 10 I_1 er Ile, Val, Ala eller Leu,
 J_1 er Ser, Pro eller Thr,
 K_1 er Asn, Asp eller Gln,

X og Y er uavhengig av hverandre valgte rester med sidekjeder som er kjemisk bundet til hverandre for å danne en
 15 intramolekylær binding, hvor nevnte intramolekylære binding omfatter en disulfidbinding, en laktam- eller tioeterbinding, og Z er amino, alkylamino, dialkylamino, cykloalkylamino, arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller aralkyloksy, og med den betingelse at når A_1 er Lys, B_1 er
 20 Ala, C_1 er Val, D_1 er Arg, E_1 er Ser, F_1 er Ser, G_1 er Asn, H_1 er Leu, I_1 er Val, J_1 er Pro og K_1 er Asn, da er en eller flere av A_1 til K_1 en D-aminosyre og Z er valgt fra gruppen som omfatter alkylamino, dialkylamino, cykloalkylamino, arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller
 25 aralkyloksy.

2. En agonistanalog av amylin med aminosyresekvensen:

1A_1 -X-Asn-Thr- 5 Ala-Thr-Y-Ala-Thr- 10 Gln-Arg-Leu- B_1 -Asn-
 15 Phe-Leu- C_1 - D_1 - E_1 - 20 F $_1$ - G_1 -Asn- H_1 -Gly- 25 Pro- I_1 -Leu- J_1 -Pro-
 30 30 Thr- K_1 -Val-Gly-Ser- 35 Asn-Thr-Tyr-Z

hvor

- A_1 er Lys, Ala, Ser eller hydrogen,
 B_1 er Ala, Ser eller Thr,
 C_1 er Val, Leu eller Ile,
 35 D_1 er His eller Arg,
 E_1 er Ser eller Thr,
 F_1 er Ser, Thr, Gln eller Asn,
 G_1 er Asn, Gln eller His,
 H_1 er Phe, Leu eller Tyr,

I₁ er Ile, Val, Ala eller Leu,
 J₁ er Ser, Pro, Leu, Ile eller Thr,
 K₁ er Asn, Asp eller Gln,

X og Y er uavhengig av hverandre valgte rester med sidekjeder
 5 som er kjemisk bundet til hverandre for å danne en
 intramolekylær binding, hvor nevnte intramolekylære binding
 omfatter en disulfidbinding, en laktam- eller tioeterbinding,
 og Z er amino, alkylamino, dialkylamino, cykloalkylamino,
 arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller
 10 aralkyloksy, og med den betingelse at når

(a) A₁ er Lys, B₁ er Ala, C₁ er Val, D₁ er Arg, E₁ er Ser, F₁
 er Ser, G₁ er Asn, H₁ er Leu, I₁ er Val, J₁ er Pro og K₁
 er Asn, eller

(b) A₁ er Lys, B₁ er Ala, C₁ er Val, D₁ er His, E₁ er Ser, F₁
 15 er Asn, G₁ er Asn, H₁ er Leu, I₁ er Val, J₁ er Ser og K₁
 er Asn,

da er en eller flere av A₁ til K₁ en D-aminosyre og Z er valgt
 fra gruppen som omfatter alkylamino, dialkylamino,
 cykloalkylamino, arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy
 20 eller aralkyloksy.

3. En agonistanalog av amylin med aminosyresekvensen:

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-
 25 ³⁰Thr-K₁-Val-Gly-Ser-³⁵Asn-Thr-Tyr-Z

hvor

A₁ er Lys, Ala, Ser eller hydrogen,
 B₁ er Ala, Ser eller Thr,
 C₁ er Val, Leu eller Ile,
 30 D₁ er His eller Arg,
 E₁ er Ser eller Thr,
 F₁ er Ser, Thr, Gln eller Asn,
 G₁ er Asn, Gln eller His,
 H₁ er Phe, Leu eller Tyr,
 35 I₁ er Ala eller Pro,
 J₁ er Ile, Val, Ala eller Leu,
 K₁ er Asn, Asp eller Gln,

X og Y er uavhengig av hverandre valgte rester med sidekjeder
 som er kjemisk bundet til hverandre for å danne en

intramolekylær binding, hvor nevnte intramolekylære binding
 omfatter en disulfidbinding, en laktam- eller tioeterbinding,
 og Z er amino, alkylamino, dialkylamino, cykloalkylamino,
 arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller
 5 aralkyloksy, og med den betingelse at når A₁ er Lys, B₁ er
 Ala, C₁ er Val, D₁ er Arg, E₁ er Ser, F₁ er Ser, G₁ er Asn, H₁
 er Leu, I₁ er Pro, J₁ er Val og K₁ er Asn, da er en eller
 flere av A₁ til K₁ en D-aminosyre og Z er valgt fra gruppen
 som omfatter alkylamino, dialkylamino, cykloalkylamino,
 10 arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller
 aralkyloksy.

4. En agonistanalog av amylin med aminosyresekvensen:

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

hvor

A₁ er Lys, Ala, Ser eller hydrogen,
 B₁ er Ala, Ser eller Thr,
 20 C₁ er Val, Leu eller Ile,
 D₁ er His eller Arg,
 E₁ er Ser eller Thr,
 F₁ er Ser, Thr, Gln eller Asn,
 G₁ er Asn, Gln eller His,
 25 H₁ er Phe, Leu eller Tyr,
 I₁ er Ile, Val, Ala eller Leu,
 J₁ er Asn, Asp eller gln,

X og Y er uavhengig av hverandre valgte rester med sidekjeder
 som er kjemisk bundet til hverandre for å danne en
 30 intramolekylær binding hvor nevnte intramolekylære binding
 omfatter en disulfidbinding, en laktam- eller tioeterbinding,
 og Z er amino, alkylamino, dialkylamino, cykloalkylamino,
 arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller
 aralkyloksy, og med den betingelse at når A₁ er Lys, B₁ er
 35 Ala, C₁ er Val, D₁ er Arg, E₁ er Ser, F₁ er Ser, G₁ er Asn, H₁
 er Leu, I₁ er Val og J₁ er Asn, da er en eller flere av A₁ til
 K₁ en D-aminosyre og Z er valgt fra gruppen som omfatter
 alkylamino, dialkylamino, cykloalkylamino, arylamino,
 aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller aralkyloksy.

Foretrukne amylinagonistanaloger inkluderer 25,28,29 Pro-h-amylin, $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}$ Pro-h-amylin og $^{18}\text{Arg}^{25,28}$ Pro-h-amylin.

Aktivitet som amylinagonister kan bekreftes og kvantifiseres ved å utføre forskjellige screeningforsøk, inkluderende nucleus accumbens reseptorbindingsforsøk beskrevet i det etterfølgende i eksempel 7, etterfulgt av soleusmuskel-forsøket beskrevet i det etterfølgende eksempel 8, et forsøk med gastrisk tømning som beskrevet i det etterfølgende i eksempel 9 eller 10, eller ved evnen til å indusere hypokalsemi eller redusere postprandial hyperglykemi i pattedyr, som beskrevet heri.

Reseptorbindingsforsøket, et konkurrerende forsøk som måler forbindelsenes evne til å binde spesifikt til membranbundne amylinreseptorer er beskrevet i US patent nr. 5 264 372, utstedt 23. november 1993. Reseptorbindingsforsøket er også beskrevet i eksempel 7 i det etterfølgende. En foretrukket kilde for membranpreparatene anvendt i forsøkene er basal-forhjernen som omfatter membraner fra nucleus accumbens og omgivende regioner. Forbindelser som analyseres konkurrerer med hensyn til binding til disse reseptorpreparater med ^{125}I Bolton Hunter rotteamylin. Konkurranskurver, hvor mengden bundet (B) er plottet som en funksjon av logaritmen av konsentrasjonen av ligand er analysert ved hjelp av en computer, ved anvendelse av analyser med ikke-lineær regresjon til en 4-parameter logistikk ligning (Inplot program, GraphPAD Software, San Diego, California) eller ALLFIT programmet fra DeLean et al. (ALLFIT, versjon 2.7 (NIH, Bethesda, MD 20892)). Munson og Rodbard, Anal. Biochem. 107:220-239 (1980).

Analyser av biologiske aktivitet av amylinagonister i soleusmuskelen kan gjennomføres ved å anvende tidligere beskrevne metoder (Leighton, B. og Cooper, Nature, 335:632-635 (1988); Cooper, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7763-7766 (1988)), hvor amylinagonistaktivitet kan bestemmes ved å måle inhiberingen av insulinstimulert glyko-

gensyntese. Soleusmuskelanalysen er også beskrevet i eksempel 8 i det etterfølgende.

Metoder for å måle graden av gastrisk tømming er f.eks. angitt i Young et al., Diabetologia, 38(6):642-648 (1995). I en fenolrødt metode som er beskrevet i eksempel 9 i det etterfølgende, mottok bevisste rotter gjennom en sonde, en fargeløs gel som inneholdt metylcellulose og en fenolrødt indikator. Tyve minutter etter tilførsel ved sonde bedøves dyrene ved anvendelse av halotan, magen avdekkes og blokkeres i pylorus og nedre øsofag sfinktere, fjernes og åpnes i en alkalisk oppløsning. Mageinnholdet kan utledes fra intensiteten av fenolrødt i den alkaliske oppløsningen, som målt ved absorbansen ved en bølgelengde på 560 nm. I en tritium-glukosemetode som er beskrevet i det etterfølgende eksempel 10, blir tritium-glukose i vann tilført ved en sonde til bevisste rotter. Rottene blir forsiktig holdt tilbake ved hjelp av halen, hvis tupp er bedøvet ved hjelp av lidokain. Tritium i plasmaet separert fra haleblod samles ved forskjellige tidspunkter og detekteres i en beta-teller. Testforbindelser administreres normalt omtrent ett minutt før ovennevnte tilførsel gjennom sonden.

Effektene av amyliner eller amylinagonister på kroppsvekt kan identifiseres, evalueres eller screenes for anvendelse i metodene beskrevet i de etterfølgende eksempler 1-3, eller andre innen teknikken kjente eller ekvivalente metoder for å bestemme virkningen på kroppsvekt. Foretrukne amylinagonistforbindelser utviser aktivitet i reseptorbindingsforsøket i størrelsesorden mindre enn omtrent 1 til 5 nM, foretrukket mindre enn omtrent 1 nM og mere foretrukket mindre enn omtrent 50 pM. I soleusmuskelforsøket, viser foretrukne amylinagonistforbindelser EC_{50} verdier i størrelsesorden som er mindre enn omtrent 1 til 10 μ M. I forsøkene med gastrisk tømming, viser foretrukne agonistforbindelser ED_{50} verdier i størrelsesorden som er mindre enn 100 μ g/rotte.

Amylin og peptidamylinagonister kan fremstilles ved anvendelse av standard fast-fase peptidsynteseteknikker og

foretrukket ved hjelp av en automatisert eller semiautomatisert peptidsyntetisator. Ved anvendelse av slike teknikker vil typisk en α -N-karbamoyl-beskyttet aminosyre og en aminosyre festet til den voksende peptidkjede på en harpiks

5 kobles ved romtemperatur i et inert løsningsmiddel slik som dimetylformamid, N-metylpyrrolidinon eller metylenklorid i nærvær av koblingsmidler slik som dicykloheksylkarbodiimid og 1-hydroksybenzotriazol i nærvær av en base som diisopropyletylamin. α -2N-karbamoyl-beskyttelsesgruppen fjernes fra den

10 resulterende peptid-harpiks ved anvendelse av et reagens slik som trifluoreddiksyre eller piperidin, og koblingsreaksjonen gjentas med den neste ønskede N-beskyttede aminosyre som skal adderes til peptidkjeden. Passende N-beskyttende grupper er vel kjent innen teknikken, hvor t-butyloksykarbonyl (tBoc) og

15 fluorenylmetoksykarbonyl (Fmoc) er foretrukne heri.

Løsningsmidlene, aminosyrederivatene og 4-metylbenzhydrylamidharpiksen anvendt i peptidsyntetisatoren kan oppnås fra Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA). De følgende

20 sidekjede-beskyttede aminosyrer kan oppnås fra Applied Biosystems, Inc.: 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) og Fmoc-

25 Gln(Trt). Boc-His(BOM) kan oppnås fra Applied Biosystems, Inc. eller Bachem Inc. (Torrance, CA). Anisol, metylsulfid, fenol, etanditiol og tioanisol kan oppnås fra Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI). Air Products and Chemicals (Allentown, PA) tilveiebringer HF. Etyleter, eddiksyre og

30 metanol kan oppnås fra Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

Fast-fase peptidsyntese kan gjennomføres med en automatisk peptidsyntetisator (modell 430A, Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) ved anvendelse av NMP/HOBt (Option 1)

35 systemet og Tbc eller Fmoc kjemien (se Applied Biosystems User's Manual for the ABI 430A Peptide Synthesizer, Version 1.3B, 1. juli, 1988, del 6, side 49-70, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) med "capping". Boc-peptid harpikser kan spaltes med HF (-5°C til 0°C, i en time). Peptidet kan

ekstraheres fra harpiksen ved å alternere vann og eddiksyre, og filtratet kan frysetørkes. Fmoc-peptid harpiksene kan spaltes i henhold til standard metoder (Introduction to Cleavage Techniques, Applied Biosystems, Inc., 1990, side 5 6-12). Peptider kan også samles ved anvendelse av en Advanced Chem Tech Synthesizer (modell MPS 350, Louisville, Kentucky).

Peptider kan renses ved RP-HPLC (preparativ og analytisk) ved 10 anvendelse av et Waters Delta Prep 3000 system. En C4, C8 eller C18 preparativ kolonne (10 μ , 2,2 x 25 cm, Vydac, Hesperia, CA) kan anvendes for å isolere peptider, og renhet kan bestemmes ved anvendelse av en C4, C8 eller C18 analytisk kolonne (5 μ , 0,46 x 25 cm, Vydac). Løsningsmidler (A=0,1% 15 TFA/vann og B=0,1% TFA/CH₃CN) kan tilføres til den analytiske kolonne i en strømningsmengde på 1,0 ml/min og til en preparativ kolonne ved 15 ml/min. Aminosyreanalyser kan utføres på Waters Pico Tag systemet og prosesseres ved anvendelse av Maxima programmet. Peptider kan hydrolyseres 20 ved dampfase-syrehydrolyse (115°C, 20-24 timer).

Hydrolysater kan derivatiseres og analyseres ved hjelp av standard metoder (Cohen et al., The Pico Tag Method: A manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis, side 11-52, Millipore Corporation, Milford, MA (1989)). "Fast atom 25 bombardment" analyse kan gjennomføres ved hjelp av M-Scan, Incorporated (West Chester, PA). Massekalibrering kan utføres ved anvendelse av cesiumjodid eller cesiumjodid/glyserol. Plasmadesorpsjonsioniseringsanalyser ved anvendelse av "time of flight" deteksjon kan gjennomføres på 30 et Applied Biosystems Bio-Ion 20 massespektrometer.

Peptidforbindelser som er anvendbare i oppfinnelsen kan også fremstilles ved anvendelse av rekombinante DNA teknikker ved anvendelse av metoder som er kjent innen teknikken. Se 35 f.eks. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor (1989). Ikke-peptidforbindelser som er anvendbare i den foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved hjelp av kjente metoder.

Forbindelsene som er omtalt i det foregående kan danne salter med forskjellige uorganiske og organiske syrer og baser. Slike salter inkluderer salter fremstilt med organiske og uorganiske syrer, f.eks. HCl, HBr, H₂SO₄, H₃PO₄, trifluoreddik-
5 syre, eddiksyre, maursyre, metansulfonsyre, toluensulfonsyre, maleinsyre, fumarsyre og kamfersulfonsyre. Salter fremstilt med baser inkluderer ammoniumsalter, alkalimetallsalter, f.eks. natrium- og kaliumsalter, og jordalkalmetallsalter, f.eks. kalsium og magnesiumsalter. Acetat-, hydroklorid- og
10 triflouracetatsalter er foretrukne. Acetatsalter er de mest foretrukne. Saltene kan dannes ved hjelp av konvensjonelle metoder, som ved å reagere de frie syrene eller baseformer av produktet med en eller flere ekvivalenter av den passende base eller syre i et løsningsmiddel eller medium hvor saltet
15 er uoppløselig, eller i et løsningsmiddel slik som vann som deretter fjernes i vakuum eller ved frysetørking eller ved å bytte ionene av et eksisterende salt med et annet ion på en passende ionebytterharpiks.

20 Preparater som er anvendbare i forbindelse med oppfinnelsen kan passende tilveiebringes i form av formuleringer som er egnet for parenteral (inkluderende intravenøs, intramuskulær og subkutan) eller nasal eller oral administrering. Et passende administreringsformat kan best bestemmes av en lege
25 for hver pasient individuelt. Passende farmasøytiske aksepterbare bærere og deres formulering er beskrevet i standard formulerings-skrifter, f.eks. Remington's Pharmaceutical Sciences av E.W. Martin. Se også Wang, Y.J. og Hanson, M.A. "Parenteral Formulations of Proteins and
30 Peptides: Stability and Stabilizers", Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report nr. 10, Supp. 42:2S (1988). Forbindelser tilveiebragt som parenterale preparater for injeksjon eller infusjon kan f.eks. være suspendert i en inert olje, passende en vegetabilsk olje slik som sesamolje,
35 jordnøttolje, olivenolje eller annen akseptierbar bærer. De er foretrukket suspendert i en vandig bærer, f.eks. en isoton bufferopløsning med en pH på omtrent 5,6 til 7,4. Disse preparater kan steriliseres ved konvensjonelle steriliseringsteknikker eller de kan sterilfiltreres. Preparatene

kan inneholde farmasøytisk aksepterbare hjelpesubstanser som er nødvendige for å approksimere fysiologiske betingelser, slik som pH buffermidler. Anvendbare buffere inkluderer f.eks. natriumacetat/eddiksyrebuffere. En preparatform med magasin eller "depot" sakte frigivelse kan anvendes slik at terapeutiske effektive mengder av preparatet avleveres inn i blodstrømmen over flere timer eller døgn etter transdermal injeksjon eller avlevering.

Disse parenterale doseringsformer fremstilles foretrukket i henhold til den felles eide patentsøknad med tittel "Parenteral, Liquid Formulations for Amylin Agonist Peptides" nr. 60/035,140, innsendt 8. januar 1997, og US patentsøknad nr. 09/005,262, innsendt 8. januar 1998, og inkluderer henholdsvis omtrent 0,01 til 0,5% (vekt/volum) av et amylin eller en amylinagonist i et vandig system sammen med omtrent 0,02 til 0,5% (vekt/volum) av en acetat-, fosfat-, citrat- eller glutamatbuffer for å oppnå en pH i sluttblandingen på omtrent 3,0 til 6,0 (mere foretrukket fra 3,0 til 5,5), såvel som omtrent 1,0 til 10% (vekt/volum) av et karbohydrat eller flerverdi alkoholtonikum i en vandig kontinuerlig fase. Omtrent 0,005 til 1,0% (vekt/volum) av et antimikrobielt preserveringsmiddel valgt fra gruppen omfattende m-kresol, benzylalkohol, metyl, etyl, propyl og butylparabener og fenol er også tilstede i den foretrukne produktformulering utformet slik at pasienten kan ta ut multiple doser. En stabilisator er ikke nødvendig. En tilstrekkelig mengde vann for injeksjon anvendes for å oppnå den ønskede oppløsningskonsentrasjon. Natriumklorid såvel som andre eksipienser kan også være tilstede om ønsket. Slike eksipienser må imidlertid opprettholde den totale stabilitet av amylinet eller amylinagonistpeptidet. Flytende formuleringer bør i alt vesentlig være isotoniske, dvs. innen $\pm 20\%$ isotonisitet, foretrukket innen 10% isotonisitet. I amylin- eller amylinagonistformuleringen for parenteral administrering er den flerverdige alkohol mest foretrukket mannitol, bufferen er en acetatbuffer, preserveringsmiddelet er omtrent 0,1 til 0,3% (vekt/volum) av m-kresol og pH er omtrent 3,7 til 4,3.

Den ønskede isotonisitet kan oppnås ved anvendelse av natriumklorid eller andre farmasøytisk aksepterbare salter.

Om ønsket kan oppløsninger av de ovennevnte blandinger tyknes med et tykningsmiddel slik som metylcellulose. De kan fremstilles i en emulgert form, enten vann-i-olje eller olje-i-vann. Et hvilket som helst av en rekke farmasøytisk aksepterbare emulgeringsmidler kan anvendes inkluderende f.eks. akasiepulver, en ikke-ionisk surfaktant (slik som Tween), eller en ionisk surfaktant (slik som alkalipolyeteralkoholsulfater eller sulfonater, f.eks. en Triton).

Preparater som kan anvendes i forbindelse med oppfinnelsen fremstilles ved å blande bestanddelene i henhold til generelt aksepterte prosedyrer. De valgte komponenter kan f.eks. simpelthen blandes i en blander eller annen standard innretning for å fremstille en konsentrert blanding som deretter kan innstilles til sluttkonsentrasjonen og viskositet ved tilsetning av vann eller tykningsmiddel og eventuelt en buffer for å regulere pH eller et ytterligere oppløst produkt for å regulere tonisitet.

For anvendelse av legen, vil preparatene tilveiebringes i en doseringsform som inneholder en mengde av et amylin eller en amylinagonist, f.eks. en amylinagonistanalogforbindelse som vil være effektiv i en eller flere multiple doser for å kontrollere fedme ved ønsket nivå. Terapeutiske effektive mengder av et amylin eller en amylinagonist, slik som en amylinagonistanalog, for anvendelse i forbindelse med kontroll av fedme er dem som reduserer kroppsvekt. Som de fagkyndige vil vite, vil en effektiv mengde av et terapeutisk middel variere med en rekke faktorer som inkluderer pasientens alder og vekt, pasientens fysiske tilstand, den ønskede virkning og andre trekk.

35

De effektive enkle, oppdelte eller kontinuerlige analgetiske doser av forbindelsene, f.eks. inkluderende $^{25,28,29}\text{Pro-h-amylin}$, $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-amylin}$ og $^{18}\text{Arg}^{25,28}\text{Pro-h-amylin}$ er i området fra omtrent 0,01 mg/døgn til omtrent 5 mg/døgn,

foretrukket fra omtrent 0,05 mg/døgn til omtrent 2 mg/døgn og mere foretrukket fra omtrent 0,1 mg/døgn til 1 mg/døgn, for en pasient som veier 70 kg, administrert i en enkel dose, i oppdelte doser eller i kontinuerlige doser. Den eksakte dose
5 for administrering bestemmes av den behandlende lege og er avhengig av en rekke faktorer som inkluderer dem som er angitt i det foregående. Administrering bør begynne ved det første tegn på fedme. Administrering kan være ved injeksjon eller infusjon, foretrukket intravenøs, subkutan eller
10 intramuskulær. Oralt aktive forbindelser kan tas oralt, men doseringer bør imidlertid økes 5-10 ganger.

Forbindelsene som anvendes i henhold til oppfinnelsen administreres til pasienter med behov for slik behandling i
15 en dose som er lik dem som er angitt i det foregående. Forbindelsene kan administreres oftere, f.eks. en, to eller tre ganger pr. døgn eller kontinuerlig. Dosene av peptidagonister, f.eks. pramlintid, administreres foretrukket subkutan i 30-300 µg doser som er angitt fra en til fire
20 ganger pr. døgn, mere foretrukket fra 30-120 µg doser gitt to til fire ganger pr. døgn.

For å understøtte forståelsen av den foreliggende oppfinnelse, er det etterfølgende eksempel inkludert som
25 beskriver resultatene fra en rekke forsøk.

Eksempel 1

Måling av kroppsvekt: 4 ukers studie i type 2 diabetikere som krever insulin

30 Studiedeltagere var menn og kvinner fra 25 til 78 år gamle med en historie med type II diabetes mellitus som krever behandling med insulin i minst 6 måneder før pre-screening besøket. Pasientene hadde en kroppsvekt som ikke varierte mer enn 45% fra den ønskelige vekt før de ble tatt opp i
35 studiet (basert på Metropolitan Life Tables). Studiet anvendte metoder beskrevet i Thompson et al., Diabetes 46:632-636 (1997). Etter en placebo innledningsperiode, ble pasienter randomisert for å motta placebo eller en eller tre dosekurer av ^{25,28,29}Pro-h-amylin (pramlintid) i 4 uker: 30 µg

QID (før frokost, lunch, middag og aften-snack), 60 μg TID (før frokost, lunch og middag) eller 60 μg QID (før frokost, lunch, middag og aften-snack). Gjennom hele legemiddelstudieperioden, tok pasientene selv fire injeksjoner av legemiddel daglig, innen 15 minutter etter hvert måltid og etter aften-snacken. Under dobbel-blindperioden, fikk pasienter randomisert til pramlintid 60 μg TID administrert placebo før aftens-snacken. Både pramlintid og placebo ble administrert som separate injeksjoner inn i det subkutane vev i den fremre abdominalvegg, idet det spesifikke sted ble endret etter hver injeksjon. Pasienter ble instruert om å forbli på deres vanlige diett, insulin og mosjonskurer gjennom hele studiet, dersom ikke annet ble instruert av undersøkeren, og de ble bedt om å avstå fra alkoholiske drikkevarer før alle klinikkbesøk.

Som vist i tabell I, var der en statistisk signifikant vekt-reduksjon fra basislinje til uke 4 innen pramlintid 60 μg TID (gjennomsnitt = -0,89 kg, $p = 0,0056$) og pramlintid 60 μg QID (gjennomsnitt = -0,72 kg, $p = 0,0014$) gruppene. Med Hochberg justeringen for multiple sammenligninger, var der ingen statistisk signifikant endring i kroppsvekt fra basislinje til uke 4 i noen av de tre pramlintidgrupper sammenlignet med placebogruppen. Således forbedret pramlintidadministrering med kontinuerlig insulinbruk glykemisk kontroll med et fall i kroppsvekt som nådde statistisk signifikans innen 60 μg TID og QID gruppene. Dette fall er i skarp kontrast til vektøkningen som vanligvis assosieres med forbedret glukosekontroll oppnådd med insulin alene i pasienter med type 2 diabetes.

Tabell I. Kroppsvekt: Forandring fra basislinje til uke 4

Behandlings- gruppe	N	Basis- linje	Forandring i uke 4		p-verdi*	
		Gjennom- snitt (kg)	Gjennom- snitt (kg)	Midlere (kg)	Innen studium- legemiddel- gruppen	Placebo sammen- ligning
Placebo	47	87,0	-0,04	0,0	NS	NAP
Pramlintid 30 µg QID	47	88,5	-0,36	-0,45	NS	NS
Pramlintid 60 µg TID	48	86,2	-0,89	-1,05	0,0056	NS
10 Pramlintid 60 µg QID	51	91,5	-0,72	-0,45	0,0014	NS

* Student's t-test (innen studiumlegemiddelgruppe sammenligning). To-veis ANOVA (placebo sammenligning) med Hochberg justeringen.

NS = ikke statistisk signifikant, NAP = ikke anvendbar

15

Eksempel 2

Måling av kroppsvekt: 52-ukes studie i type 1 diabetikere

Dette studium var et multisenter, dobbel-blind, placebo-
 20 kontrollert, parallell gruppe studium med en potensiell dose-
 eskalering. Deltagere i studiet var menn og kvinner mellom
 16 og 70 år med type 1 diabetes mellitus. Fire subkutane
 injeksjoner av 30 µg pramlintid eller placebo ble selv-
 administrert daglig, en før hvert måltid og før en snack før
 25 sengetid. Noen pasienter (dem på pramlintid som hadde en
 reduksjon av HbA1c fra basislinje på mindre enn 1,0% etter 13
 ukers behandling) ble rerandomisert etter 20 uker til enten
 30 µg eller 60 µg QID for resten av studiet. Pasienter i
 dette studium ble behandlet med studium-medikament formulert
 30 ved pH 4,0 ved en konsentrasjon som tillater injeksjon av
 0,1 ml pr. dose. 477 pasienter mottok minst en dose av
 studium-medisiner (pramlintid eller placebo). Av de 477
 pasienter som var randomisert og dosert, fullførte 341 52-
 ukers studiet.

35

Pasienter behandlet med pramlintid erfarte et klinisk
 meningsfullt og statistisk signifikant fall i kroppsvekt,
 sammenlignet med placebo, etter 13, 26 og 52 uker (tabell
 II). Den største forskjell fra placebo ble observert etter

26 uker og 52 uker (et fall på minst 1,2 kg sammenlignet med placebo på hvert tidspunkt). Vekttap forekom særlig hos de pasienter som hadde en basislinje-kroppsmasseindeks (BMI) på minst 27,0 kg/m², noe som indikerer den største fordel blant
5 overvektige/tykke pasienter (tabell III).

Pasienter som tar pramlintid innen undergruppen av pasienter med basislinje HbA1c nivåer på minst 8,0% og stabil insulin erfarte et gjennomsnittlig fall i kroppsvekt sammenlignet med
10 placebo på alle de tre tidspunkter (tabell IV). Denne observasjon er overensstemmende med den vel kjente effekt av insulin for å fasilitere kroppsvektøkning. Således synes pramlintid å redusere insulinindusert vektøkning.

15 Normalfordelte data ble analysert ved anvendelse av toveis variansanalyse. I de tilfeller hvor det ble funnet at data ikke fulgte normalfordeling, ble ikke-parametriske metoder (Kruskal-Wallis test) basert på rang anvendt. I disse tilfeller er Hodges-Lehman estimatoren for forskjellen fra
20 placebo tilstede i stedet for gjennomsnittet.

Tabell II

Kroppsvekt: Forandringer fra basislinje
Vekt ved uke 13, 16 og 52

	Tidspunkt/kroppsvekt (kg)	Placebo (N=154)	Pramlintid 30 eller 60 µg QID (N=163)
	Basislinje		
10	Gjennomsnitt (SE)	76,3(1,1)	76,4(1,1)
	Midlere	75,0	75,9
	Område	47, 121,8	46,4, 113,6
	Uke 13 (3 måneder)		
15	Gjennomsnitt (SE)	76,5(1,1)	75,4(1,1)
	Midlere	75,1	75,6
	Område	45, 125,7	47,3(110,5)
	Forandring fra basislinje		
20	Gjennomsnitt (SE)	0,2(0,2)	-1,0(0,2)
	Midlere	0	-1,0
	Område	-6,0, 8,2	-7,6, 8,2
25	Hodges-Lehman estimator for forskjell fra Placebo	-	-1,2
	p-verdi †	-	0,0001*
	Uke 26 (6 måneder)		
30	Gjennomsnitt (SE)	76,9(1,1)	75,5(1,1)
	Midlere	75,9	76,4
	Område	45,8, 126,8	46,4, 111,2
	Forandring fra basislinje		
35	Gjennomsnitt (SE)	0,6(0,2)	-0,9(0,3)
	Midlere	0,55	-0,5
	Område	-7,3, 9,3	-23,5, 9,1
40	Hodges-Lehman estimator for forskjell fra Placebo	-	-1,3
	p-verdi †	-	0,0001*
	Uke 52 (12 måneder)		
45	Gjennomsnitt (SE)	77,1(1,1)	76,0(1,1)
	Midlere	75,7	76,4
	Område	44,8, 126,8	48,2, 109,9
	Forandring fra basislinje		
50	Gjennomsnitt (SE)	0,8(0,3)	-0,5(0,3)
	Midlere	0,8	-0,5
	Område	-11,5, 11,2	-12,0, 13,7
55	Gjennomsnittlig forskjell fra Placebo	-	-1,3
	p-verdi †	-	0,0137*

† Kruskal-Wallis test

‡ Toveis ANOVA

* Statistisk signifikant forskjell sammenlignet med Placebo

Tabell III

Kroppsvekt: Forandringer fra basislinje for pasienter med
basislinje BMI $\geq 27,0$ kg/m² eller $< 27,0$ kg/m²
Vekt ved uke 13, 26 og 52

	BMI undergruppe/kroppsvekt (kg)	Placebo (N=154)	Pramlintid 30 eller 60 µg QID (N=164)
5			
	Basislinje BMI $\geq 27,0$ kg/m ²		
	Forandring i uke 52	51	53
10	N	0,4 (0,53)	-1,8 (0,65)
	Gjennomsnitt (SE)	-6,4, 11,2	-12,0, 9,1
	Område		
	Basislinje BMI $< 27,0$ kg/m ²		
	Forandring i uke 52	103	110
15	N	1,0 (0,36)	0,1 (0,28)
	Gjennomsnitt (SE)	-11,5, 11,2	-5,0, 13,7
	Område		
20			

Tabell IV

Kroppsvekt: Forandringer fra basislinje
 Pasienter med HbA_{1c} > 8,0%, insulin innen ±10% av basislinjevekt i uke 13, 26 og 52

5	Tidspunkt/kroppsvekt (kg)	Placebo (N=31)	Pramlintid 30 eller 60 µg QID (N=39)
	Basislinje		
	Gjennomsnitt (SE)	75,9 (2,2)	81,3 (2,2)
	Midlere	74,6	79,4
10	Område	52,4, 113,6	55,5, 113,6
	Uke 13 (3 måneder)		
	Gjennomsnitt (SE)	75,8 (2,1)	80,3 (2,1)
	Midlere	74,1	78,6
15	Område	56,5, 108,2	56,4, 110,5
	Forandring fra basislinje		
	Gjennomsnitt (SE)	-0,1 (0,4)	-1,0 (0,4)
	Midlere	0	-1,4
20	Område	-6,4, 4,1	-7,6, 8,2
	Gjennomsnittlig forskjell fra Placebo	-	-0,9
	p-verdi †	-	0,0745
25			
	Uke 26 (6 måneder)		
	Gjennomsnitt (SE)	76,2 (2,0)	80,8 (2,1)
	Midlere	75,9	80,5
30	Område	54,9, 108,2	55,5, 111,2
	Forandring fra basislinje		
	Gjennomsnitt (SE)	0,3 (0,5)	-0,5 (0,6)
	Midlere	0,4	0
35	Område	-5,4, 5,9	-10,5, 9,1
	Gjennomsnittlig forskjell fra Placebo	-	-0,8
	p-verdi †	-	0,1197
40			
	Uke 52 (12 måneder)		
	Gjennomsnitt (SE)	76,5 (2,1)	81,7 (2,1)
	Midlere	75,9	79,6
	Område	54,5, 109,1	56,4, 109,9
45	Forandring fra basislinje		
	Gjennomsnitt (SE)	0,6 (0,7)	0,4 (0,6)
	Midlere	0,7	0,2
	Område	-7,0, 11,2	-10,0, 13,7
50	Gjennomsnittlig forskjell fra Placebo	-	-0,2
	p-verdi †	-	0,2441

55 † Toveis ANOVA

* Statistisk signifikant forskjell sammenlignet med Placebo

Eksempel 3

Måling av kroppsvekt: 52-ukers studium i type 2 diabetikere som ikke krever insulin

- 5 Dette studium var et multisenter, dobbel-blind, placebo-kontrollert, parallell gruppe, dosevariasjons-studium. Studiedeltagere var menn og kvinner mellom 18 og 75 år med

type 2 diabetes mellitus som krever insulin. Tre subkutane injeksjoner av pramlintid (30, 75 eller 150 μg TID) eller placebo (TID) ble selv-administrert daglig, en før hvert måltid i 52 uker. Pasienter i dette studiet ble behandlet med studium-medikasjon utformet med pH 4,7 ved en konsentrasjon som krever injeksjon av 0,3 ml pr. dose. Dobbel-blind behandlingsperioden kom etter en fra 3- til 10-dagers enkel-blind placebo innledningsperiode. Av de 359 pasienter som var randomiserte og doserte fullførte 381 52-ukers studiet.

Pasienter behandlet med noen av de tre doser av pramlintid opplevde et klinisk meningsfylt og statistisk signifikant fall i kroppsvekt, sammenlignet med placebo, etter 13, 26 og 52 uker (tabell V). Den største forskjell fra placebo ble observert etter 26 uker og 52 uker (et fall på 2,3 og 2,7 kg sammenlignet med placebo på disse tidspunkter). Vekten til placebobehandlede pasienter økte i forhold til basislinje på alle de tre tidspunkter i motsetning til vektfallene i de tre pramlintid-gruppene ved alle tidspunkter. Vekttap forekom både hos de pasienter som har en basislinje-kropps masseindeks (BMI) på minst 27,0 kg/m^2 , og dem med en basislinje BMI som er mindre enn 27,0 kg/m^2 (tabell VI).

Pramlintidpasienter i alle de tre gruppene med basislinje HbA1c nivåer på minst 8,0% og stabil insulin erfarte et fall i kroppsvekt sammenlignet med placebo ved alle tidspunkter (tabell VII). Størrelsesordenen av responsen var generelt sammenlignbar med det som observeres for alle pasienter, noe som foreslår en effekt som er uavhengig av forandringer i insulin dose.

Normalfordelte data ble analysert ved anvendelse av toveis variansanalyse (med Hochberg justeringen til Bonferroni prosedyren for multiple sammenligninger). I tilfeller hvor data ikke ble funnet til å følge en normalfordeling, ble ikke-parametriske metoder (Kruskal-Wallis test) basert på rang anvendt. I disse tilfeller blir Hodges-Lehman

estimatoren for forskjellen fra placebo angitt i stedet for gjennomsnittet.

Tabell V

5 Kroppsvekt: Forandringer fra basislinje
Vekt ved uke 13, 26 og 52

10	Tidspunkt/kroppsvekt (kg)	Placebo (N=89)	Pramlintid 30 µg TID (N=86)	Pramlintid 75 µg TID (N=93)	Pramlintid 75 µg TID (N=77)
	Basislinje				
15	Gjennomsnitt (SE)	90,6(1,6)	90,3(1,8)	93,2(1,8)	94,3(2,1)
	Midlere	90,3	89,15	92,3	95,7
	Område	59,5, 130,9	60,0, 140,0	51,8, 165,0	57,3, 158,1
	Uke 13 (3 måneder)				
20	Gjennomsnitt (SE)	91,3(1,6)	89,8(1,8)	92,5(1,9)	92,7(2,1)
	Midlere	90,0	89,3	92,3	92,3
	Område	60,5, 132,9	57,7, 142,7	49,1, 166,8	56,4, 156,8
	Forandring fra basislinje				
25	Gjennomsnitt (SE)	0,6(0,2)	-0,5(0,3)	-0,6(0,4)	-1,6(0,3)
	Midlere	0,5	-0,7	-0,4	-1,4
	Område	-6,9, 8,7	-7,7, 10,5	-23,4, 9,5	-9,5, 2,7
30	Hodges-Lehman estimator for forskjell fra Placebo	-	-1,1	-0,9	-2,0
	p-verdi †	-	0,0006*	0,0066*	0,0001*
	Uke 26 (6 måneder)				
35	Gjennomsnitt (SE)	91,5(1,7)	89,7(1,8)	92,3(1,8)	92,6(2,1)
	Midlere	90,5	89,1	92,3	92,3
	Område	58,6, 133,0	55,9, 140,9	46,4, 162,5	58,2, 156,4
40	Forandring fra basislinje				
	Gjennomsnitt (SE)	0,8(0,3)	-0,6(0,3)	-0,9(0,5)	-1,7(0,3)
	Midlere	0,9	-0,45	0,0	-1,5
	Område	-5,3, 8,3	-10,7, 11,4	-24,7, 9,0	-10,0, 3,2
45	Hodges-Lehman estimator for forskjell fra Placebo	-	-1,3	-1,3	-2,3
	p-verdi †	-	0,0005*	0,0029*	0,0001*
	Uke 52 (12 måneder)				
50	Gjennomsnitt (SE)	91,9(1,7)	89,6(1,9)	92,3(1,9)	92,4(2,1)
	Midlere	90,0	89,05	92,7	92,7
	Område	60,5, 136,6	55,9, 147,3	46,6, 170,8	56,4, 158,2
55	Forandring fra basislinje				
	Gjennomsnitt (SE)	1,2(0,4)	-0,6(0,4)	-0,9(0,5)	-1,9(0,7)
	Midlere	0,9	-0,4	-0,3	-1,8
	Område	-8,0, 20,5	-13,6, 11,9	-31,1, 10,0	-43,2, 7,3
60	Hodges-Lehman estimator for forskjell fra Placebo	-	-1,6	-1,4	-2,7
65	p-verdi †	-	0,0009*	0,0106*	0,0001*

† Kruskal-Wallis test med Hochberg justering for multiple sammenligninger versus Placebo

* Statistisk signifikant forskjell sammenlignet med Placebo

Tabell VI

Kroppsvekt: Forandringer fra basislinje for pasienter med basislinje
 BMI \geq 27,0 kg/m² eller <27,0 kg/m²
 Vekt ved uke 13, 26 og 52

5

BMI undergruppe/- kroppsvekt (kg)	Placebo (N=91)	Pramlintid 30 μ g TID (N=88)	Pramlintid 75 μ g TID (N=97)	Pramlintid 150 μ g TID (N=80)
10 Basislinje BMI \geq 27,0 kg/m ²				
Forandring i uke 52	67	67	80	62
N	0,7(0,43)	-0,3(0,52)	-0,7(0,47)	-1,8(0,80)
Gjennomsnitt(SE) Område	-8,0, 10,0	-13,6, 11,9	-13,7, 10,0	-43,2, 7,3
15 Basislinje BMI<27,0 kg/m ²				
Forandring i uke 52	24	21	17	18
N	2,4(1,08)	-0,7(0,56)	-1,7(2,07)	-1,9(0,71)
20 Gjennomsnitt(SE) Område	-3,4, 20,5	-4,7, 6,4	-31,1, 9,0	-7,2, 6,5

Tabell VII

Kroppsvekt: Forandringer fra basislinje
 Pasienter med HbA_{1c} > 8,0%, insulin innen ±10% av basislinjevekt ved uke 13, 26 og 52

5

Tidspunkt/- kroppsvekt (kg)	Placebo (N=26)	Pramlintid 30 µg TID (N=20)	Pramlintid 75 µg TID (N=22)	Pramlintid 150 µg TID (N=18)
Basislinje				
10 Gjennomsnitt (SE)	84,3 (2,9)	92,7 (3,5)	93,3 (3,2)	99,8 (5,6)
Midlere	82,15	89,75	90,9	98,9
Område	61,4 115,7	65,0, 119,5	65,0, 121,8	59,5, 158,1
Uke 13 (3 måneder)				
15 Gjennomsnitt (SE)	84,3 (2,8)	92,5 (3,6)	93,3 (3,3)	98,3 (5,7)
Midlere	81,5	88,85	91,6	97,4
Område	60,5, 112,3	65,9, 123,4	67,3, 121,8	57,7, 156,8
Forandring fra basislinje				
20 Gjennomsnitt (SE)	0,0 (0,2)	-0,2 (0,5)	-0,0 (0,7)	-1,5 (0,4)
Midlere	0,45	-0,55	0	-1,55
Område	-3,4, 1,9	-4,6, 6,4	-5,9, 6,4	-3,9, 2,7
Hodges-Lehman estimator for forskjell fra Placebo p-verdi †				
25	-	-0,5 0,2812	-0,4 0,5827	-1,9 0,0005*
Uke 26 (6 måneder)				
30 Gjennomsnitt (SE)	84,8 (2,9)	92,4 (3,6)	93,1 (3,3)	98,1 (5,6)
Midlere	83,15	89,75	91,8	97,5
Område	60,9, 117,5	64,1, 123,6	71,8, 121,1	58,9, 156,4
Forandring fra basislinje				
35 Gjennomsnitt (SE)	0,5 (0,3)	-0,3 (0,5)	-0,1 (0,8)	-1,8 (0,5)
Midlere	0,7	-0,45	0	-1,4
Område	-2,7, 4,7	-3,7, 4,1	-6,8, 7,3	-5,4, 2,0
Hodges-Lehman estimator for forskjell fra Placebo p-verdi †				
40	-	-0,8 0,8903	-0,6 0,3616	-2,2 0,0552
Uke 52 (12 måneder)				
45 Gjennomsnitt (SE)	85,2 (2,9)	91,9 (3,5)	93,4 (3,1)	95,3 (5,5)
Midlere	83,3	89,05	92,05	94,0
Område	60,9, 115,0	66,7, 122,7	70,0, 116,2	57,3, 158,2
Forandring fra basislinje				
50 Gjennomsnitt (SE)	0,9 (0,7)	-0,8 (0,4)	0,1 (1,0)	-4,6 (2,3)
Midlere	0,45	-0,65	0,7	-2,55
Område	-4,6, 14,3	-4,1, 3,2	-8,6, 10,0	-43,2, 2,3
Gjennomsnittlig forskjell fra Placebo p-verdi †				
55	-	-1,8 0,1837	-0,8 0,2377	-5,5 0,0069*
60	-	-	-	-

† Kruskal-Vallis test med Hochberg justering for multiple sammenligninger versus Placebo

‡ Toveis ANOVA med Hochberg justering for multiple sammenligninger versus Placebo

* Statistisk signifikant forskjell sammenlignet med Placebo

65

Eksempel 4**Fremstilling av $^{25,28,29}\text{Pro-h-Amylin}$**

Fast-fase syntese av $^{25,28,29}\text{Pro-h-Amylin}$ ved anvendelse av metylbenzhydrylaminanker-bindingsharpiks og $\text{N}^{\text{a}}\text{-Boc/benzyl-}$ sidekjedebeskyttelse ble gjennomført ved hjelp av standard peptidsyntesemetoder. $^{2,7}\text{-[disulfid]amylin-MBHA-harpiksen}$ ble oppnådd ved behandling av Acm-beskyttede cysteiner med tallium (III) trifluoracetat i trifluoreddiksyre. Etter at ringdannelse var oppnådd ble harpiksen og sidekjede- beskyttelsesgruppene avspaltet med flytende HF i nærvær av dimetylsulfid og anisol. $^{25,28,29}\text{Pro-h-Amylin}$ ble renset ved preparativ revers-fase HPLC. Peptidet ble funnet til å være homogent ved analytisk HPLC og kapillærelektroforese og strukturen ble bekreftet ved aminosyreanalyse og sekvensanalyse. Produktet ga det ønskede masseion. FAB massespektrum: $(\text{M}+\text{H})^+=3949$.

Eksempel 5**Fremstilling av $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-Amylin}$**

Fast-fase syntese av $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-Amylin}$ ved anvendelse av metylbenzhydrylaminanker-bindingsharpiks og $\text{N}^{\text{a}}\text{-Boc/benzyl-}$ sidekjedebeskyttelse ble gjennomført ved hjelp av standard peptidsyntesemetoder. $^{2,7}\text{-[disulfid]amylin-MBHA-harpiksen}$ ble oppnådd ved behandling av Acm-beskyttede cysteiner med tallium (III) trifluoracetat i trifluoreddiksyre. Etter oppnådd ringdannelse ble harpiksen og sidekjede-beskyttelsesgruppene avspaltet med flytende HF i nærvær av dimetylsulfid og anisol. $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-Amylin}$ ble renset ved preparativ revers-fase HPLC. Peptidet ble funnet til å være homogent ved analytisk HPLC og kapillærelektroforese og strukturen ble bekreftet ved aminosyreanalyse og sekvensanalyse. Produktet ga det ønskede masseion. FAB massespektrum: $(\text{M}+\text{H})^+=3971$.

Eksempel 6**Fremstilling av $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-Amylin}$**

Fast-fase syntese av $^{18}\text{Arg}^{25,28,29}\text{Pro-h-Amylin}$ ved anvendelse av metylbenzhydrylaminanker-bindingsharpiks og $\text{N}^{\text{a}}\text{-Boc/benzyl-}$ sidekjedebeskyttelse ble gjennomført ved hjelp av standard peptidsyntesemetoder. $^{2,7}\text{-[disulfid]amylin-MBHA-harpiksen}$ ble

oppnådd ved behandling av Acn-beskyttede cysteiner med tallium (III) trifluoracetat i trifluoreddiksyre. Etter at ringdannelser ble oppnådd ble harpiksen og sidekjede- beskyttelsesgruppene avspaltet med flytende HF i nærvær av dimetylsulfid og anisol. $^{18}\text{Arg}^{25,28}\text{Pro-h-Amylin}$ ble rensset ved preparativ revers-fase HPLC. Peptidet ble funnet til å være homogent ved analytisk HPLC og kapillærelektroforese og strukturen ble bekreftet ved aminosyreanalyse og sekvens-analyse. Produktet ga det ønskede masseion. FAB massespektrum: $(\text{M}+\text{H})^+=3959$.

Eksempel 7

Reseptor bindingsforsøk

Evaluering av bindingen av forbindelser til amylinreseptorer ble gjennomført som følger. ^{125}I -rotteamylin (Bolton-Hunter merket i det N-terminale lysin) ble oppnådd fra Amersham Corporation (Arlington Heights, IL). Spesifikke aktiviteter på brukertidspunktet var fra 1950 til 2000 Ci/mmol. Umerkede peptider ble oppnådd fra BACHEM Inc. (Torrance, CA) og Peninsula Laboratories (Belmont, CA).

Sprague-Dawley hannrotter (200-250 gram) ble avlivet ved dekapitasjon. Hjernene ble fjernet og anbragt i kald fosfat-bufret saltoppløsning (PBS). Fra bukoverflaten ble snitt utført rostralt til hypotalamus, begrenset lateralt ved tractus olfactorius og som strekker seg i en 45° vinkel medialt fra disse. Dette basale forhjernevev som inneholdt nucleus accumbens og omgivende regioner ble veid og homogenisert i iskald 20 mM HEPES buffer (20 mM HEPES syre, pH justert til 7,4 med NaOH ved 23°C). Membraner ble vasket tre ganger i nylaget buffer ved sentrifugering i 15 minutter ved 48 000 x g. Den endelige membranpellet ble resuspendert i 20 mM HEPES buffer inneholdende 0,2 mM fenylmetylsulfonyl-fluorid (PMSF).

35

For å måle ^{125}I -amylinbinding, ble membraner fra 4 mg opprinnelig våtvekt av vev inkubert med ^{125}I -amylin ved 12-16 pM i 20 mM HEPES buffer inneholdende 0,5 mg/ml bacitracin, 0,5 mg/ml bovint serumalbumin og 0,2 mM PMSF. Oppløsninger

ble inkubert i 60 minutter ved 23°C. Inkubasjonene ble terminert ved filtrering gjennom GF/B glassfiberfiltre (Whatman Inc., Clifton, NJ) som først var blitt gjennombløtt i 4 timer i 0,3% polyetylenimin for å redusere ikke-spesifikk binding av radioaktivt merkede peptider. Filtrene ble vasket umiddelbart før filtrering med 5 ml kald PBS, og umiddelbart etter filtrering med 15 ml kald PBS. Filtrene ble fjernet og radioaktivitet ble bestemt i en gammateller med en telleeffektivitet på 77%. Sammenligningskurver ble dannet ved å måle binding i nærvær av 10^{-12} til 10^{-6} M umerket testforbindelse og ble analysert ved ikke-lineær regresjon ved anvendelse av en 4-parameter logistikk-ligning (Inplot program, GraphPAD Software, San Diego).

I dette forsøk vil rensed humant amylin binde til dets reseptor ved en målt IC_{50} på omtrent 50 pM. Resultater for testforbindelser er angitt i tabell VIII som viser at hver av forbindelsene har en signifikant reseptorbindingsaktivitet.

Eksempel 8

Soleusmuskel-forsøk

Bestemmelse av forbindelsenes amylinagonistaktivitet ble gjennomført ved anvendelse av soleusmuskel-forsøket som følger. Harlan Sprague-Dawley hannrotter med en vekt på omtrent 200 g ble anvendt for å holde massen av den delte soleusmuskel mindre enn 40 mg. Dyrene fastet i 4 timer før avliving ved dekapitasjon. Huden ble fjernet fra nedre del av benet og ble deretter strukket ut på en korkplate. Tendo achilles ble kuttet like over os calcis og m. gastrocnemius ble tatt ut fra den bakre side av tibia. S. soleus, en liten 15-20 mm lang, 0,5 mm tykk flat muskel på benoverflaten av m. gastrocnemius ble deretter fjernet og perimysium ble rensed bort ved anvendelse av fine sakser og pinsetter. M. soleus ble deretter delt i like deler ved anvendelse av et blad som ble ført antero-posterior gjennom muskelmagen for å oppnå totalt 4 muskelstrimler fra hvert dyr. Etter at muskelen var dissekert fra dyret, ble den holdt i en kort periode i fysiologisk saltoppløsning. Det var ikke nødvendig

å holde muskelen under en spenning da dette ikke hadde noen påvisbare effekter på radioglukose-innlemmelse i glykogen.

Musklene ble tilsatt til 50 ml Erlenmeyer kolber som inne-
5 holdt 10 ml av en for-gasset Krebs-Ringer bikarbonatbuffer
inneholdende (hver liter) NaCl 118,5 mmol (6,93 g), KCl
5,94 mmol (443 mg), CaCl₂ 2,54 mmol (282 mg), MgSO₄ 1,19 mmol
(143 mg), KH₂PO₄ 1,19 mmol (162 mg), NaHCO₃ 25 mmol (2,1 g),
5,5 mmol glukose (1 g) og rekombinant humant insulin
10 (Humulin-R, Eli Lilly, IN) og testforbindelsen, som angitt
detaljert i det etterfølgende. pH ved 37°C ble bekreftet til
å være mellom 7,1 og 7,4. Muskler ble fordelt i forskjellige
kolber slik at 4 muskelstykker fra hvert dyr var jevnt
fordelt blant de forskjellige analysebetingelser.
15 Inkubasjonsmediene ble gasset ved forsiktig blåsing av
karbogen (95% O₂, 5% CO₂) over overflaten under samtidig
kontinuerlig omrøring ved 37°C i et oscillerende vannbad.
Etter en halv times "preinkubasjons" periode ble 0,5 µCi U-
14C-glukose tilsatt til hver kolbe som ble inkubert i
20 ytterligere 60 minutter. Hvert muskelstykke ble deretter
raskt fjernet, avtørket og frosset i flytende N₂, veid og
lagret for påfølgende bestemmelse av 14C-glykogen.

14C-glykogen bestemmelse ble utført i et 7 ml scintillasjons-
25 rør. Hver frosne muskelprøve ble anbragt i et rør og
nedbrutt i 1 ml 60% kaliumhydroksyd ved 70°C i 45 minutter
under kontinuerlig omrøring. Oppløst glykogen ble
utpresipitert på røret ved tilsetning av 3 ml absolutt etanol
og avkjøling over natten ved -20°C. Supernatanten ble
30 aspirert forsiktig, glykogenet ble igjen vasket med etanol,
aspirert og presipitatet ble tørket under vakuum. All etanol
avdampes for å unngå bråkjøling under scintillasjonstelling.
Resterende glykogen ble oppløst på nytt i 1 ml vann og 4 ml
scintillasjonsvæske og talt med hensyn til 14C.

35

Graden av glukoseinnlemmelse i glykogen (uttrykt i µMol/g/t)
ble oppnådd fra den spesifikke aktivitet av 14C-glukose i
5,5 mM glukose av inkubasjonsmediet, og det totale 14C antall
som var tilbake i glykogenet ekstrahert fra hver muskel.

- Dose-responskurver ble tilpasset en 4-parameter logistikkmodell ved anvendelse av minste kvadraters iterative rutine (ALLFIT, v2.7, NIH, MD) for å utlede EC_{50} verdier. Da EC_{50} er log-normalfordelt, er det uttrykt som \pm standard feil av
5 logaritmen. Parvise sammenligninger ble utført ved anvendelse av t-test baserte rutiner av SYSTAT (Wilkinson, "SYSTAT: the system for statistics," SYSTAT Inc., Evanston IL (1989)).
- 10 Dose-responskurver ble oppnådd med muskler tilsatt til medier inneholdende 7,1 nM (1000 μ U/ml) insulin og hver testforbindelse tilsatt i slutt (nominelle) konsentrasjoner på 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 og 1000 nM. Hvert forsøk inneholdt også interne positive kontroller bestående av en enkelt batch av
15 arkivert rotteamylin, frysetørket og lagret ved -70°C .

Humant amylin er et kjent hyperglykemisk peptid og EC_{50} målinger av amylinpreparater i soleusmuskel-forsøket strekker seg typisk fra omtrent 1-10 nM, skjønt noen kommersielle
20 preparater som har en renhet under 90% har høyere EC_{50} verdier pga. tilstedeværelsen av kontaminanter som resulterer i en lavere målt aktivitet. Resultater for testforbindelsene er angitt i tabell VIII.

Tabell VIII

	Muskel EC ₅₀ (nM)	Reseptorbindings- forsøk IC ₅₀ (pM)	Soleus- forsøk
5	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
10	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
15	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

20 Eksempel 9

Forsøk vedrørende gastrisk tømming med fenolrødt

Gastrisk tømming ble målt under anvendelse av en modifikasjon (Plourde et al, Life Sci. 53:857-862 (1993)) av den originale metode etter Scarpignato et al (Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 25 246:286-295 (1980)). Kort, mottok bevisste rotter, gjennom en sonde, 1,5 ml av en fargeløs gel som inneholdt 1,5% metylcellulose (M-0262, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) og 0,05% fenolrødt indikator. 20 min etter tilførsel ble rottene bedøvet under anvendelse av 5% halotan, magen ble 30 åpnet og blokkert i pylorus og nedre øsofag sfinkter ved anvendelse av arterieklemmer, fjernet og åpnet i en alkalisk oppløsning som var innstilt til et fast volum. Mageinnholdet ble utledet ut fra intensiteten av fenolrødt i den alkaliske oppløsning, som målt ved absorbansen med en bølgelengde på 35 560 nm. I det fleste forsøk var magen klar. I andre forsøk, ble partikkelformet mageinnhold sentrifugert til en klar oppløsning for absorbansmålinger. Der hvor fortynnet mageinnhold forble turbid, ble den spektroskopiske absorbans som skyldes fenolrødt utledet som forskjellen mellom den tilstede 40 i alkalisk versus surgjort fortynningsmiddel. I separate forsøk på 7 rotter ble magen og tynntarmen begge skåret ut og åpnet i en alkalisk oppløsning. Mengden fenolrødt som kunne utvinnes fra den øvre mage- og tarmkanalen innen 29 min etter

ovennevnte tilførsel var $89 \pm 4\%$, idet farge som synes å binde uerholdelig til tarmlumenoverflaten kan svare for balansen. For å kompensere for dette lille tap, ble prosent av mageinnhold igjen etter 20 minutter uttrykt som en

5 fraksjon av de gastriske innhold utvunnet fra kontrollrotter avlivet umiddelbart etter sondetilførsel i det samme forsøk. Prosent gastrisk tømme-innhold tilbake = (absorbans etter 20 minutter)/(absorbans etter 0 minutter). Dose-responskurver for gastrisk tømning ble tilpasset en 4-parameter

10 logistikkmodell ved anvendelse av en minste kvadraters iterative rutine (ALLFIT, v2.7, NIH, Bethesda, MD) for å utlede ED_{50} verdi. Da ED_{50} er log-normalfordelt, er den uttrykt som \pm standard feil av logaritmen. Parvise sammenlikninger ble utført ved anvendelse av enveis

15 variansanalyser og av Student-Newman-Keuls multippel sammenligningstest (Instat v2.0, GraphPad Software, San Diego, CA) ved anvendelse av $P < 0,05$ som signifikansnivå.

I dose-responsstudier ble rotteamylin (Bachem, Torrance, CA)

20 oppløst i 0,15 M saltoppløsning administrert som en 0,1 ml subkutan bolus i doser på 0, 0,01, 0,1, 1, 10 eller 100 μg 5 min før sondetilførsel i Harlan Sprague Dawley (ikke-diabetiske) rotter som hadde fastet i 20 timer og diabetiske BB rotter som hadde fastet i 6 timer. Når subkutane

25 amylininjeksjoner ble gitt 5 minutter før sondetilførsel med fenolrødt-indikator, var der en doseavhengig suppresjon av gastrisk tømning (data ikke vist). Suppresjon av gastrisk tømning var fullstendig i normale HSD rotter som fikk administrert 1 μg amylin, og i diabetiske rotter som fikk

30 administrert 10 μg ($P = 0,22, 0,14$). ED_{50} for inhibering av gastrisk tømning i normale rotter var 0,43 μg (0,60 nmol/kg) $\pm 0,19$ log-enheter, og var 2,2 μg (2,3 nmol/kg) $\pm 0,18$ log-enheter i diabetiske rotter.

35 Eksempel 10

Gastrisk tømme-forsøk med tritium-glukose

Beviste, ikke-fastende Harlan Sprague Dawley rotter ble holdt tilbake ved hjelp av halen, hvis tupp var bedøvet ved anvendelse av 2% lidokain. Tritium i plasma separert fra

haleblod samlet 0, 15, 30, 60, 90 og 120 minutter etter sondetilførsel ble det injisert i en beta-teller. Rottene fikk injisert subkutan 0,1 ml saltoppløsning inneholdende 0, 0,1, 0,3, 1, 10 eller 100 μg rotteamylin 1 minutt før
5 sondetilførsel (n = henholdsvis 8, 7, 5, 5, 5). Etter sondetilførsel til saltoppløsnings-preinjiserte rotter av tritium-glukose, økte plasma-tritium raskt ($t_{1/2}$ på omtrent 8 minutter) til en asymptote som sakte avtok. Subkutan injeksjon med amylin avtok på doseavhengig måte og/eller
10 forsinket absorpsjon av markøren. Plasmatritiumaktivitet ble integrert gjennom 30 min. for å oppnå arealene under kurven plottet som en funksjon av amylinose. ED_{50} verdien oppnådd fra logistikk-tilpasningen var 0,35 μg amylin.

PATENTKRAV

1. Anvendelse av amylin eller en amylinagonist for fremstilling av et medisinsk middel for å redusere kroppsvekt hos et menneske, hvor nevnte medisinske middel er formulert til å avlevere en dose på omtrent 0,01 mg pr. døgn til omtrent 5 mg pr. døgn.

2. Anvendelse som angitt i krav 1, hvor nevnte amylinagonist er en amylinagonistanalog.

3. Anvendelse som angitt i krav 1, hvor nevnte amylinagonist har den etterfølgende aminosyresekvensen:

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

hvor

A₁ er Lys, Ala, Ser eller hydrogen;

B₁ er Ala, Ser eller Thr;

C₁ er Val, Leu eller Ile;

D₁ er His eller Arg;

E₁ er Ser eller Thr;

F₁ er Ser, Thr, Gln eller Asn;

G₁ er Asn, Gln eller His;

H₁ er Phe, Leu eller Tyr;

I₁ er Ile, Val, Ala eller Leu;

J₁ er Ser, Pro eller Thr;

K₁ er Asn, Asp eller Gln;

X og Y er uavhengig av hverandre valgte rester med sidekjeder som er kjemisk bundet til hverandre for å danne en intramolekylær binding, hvor nevnte intramolekylære binding omfatter en disulfidbinding, en laktam- eller tioeterbinding; og Z er amino, alkylamino, dialkylamino, cykloalkylamino, arylamino, aralkylamino, alkyloksi, aryloksi eller aralkyloksi; og med den betingelse at når A₁ er Lys, B₁ er Ala, C₁ er Val, D₁ er Arg, E₁ er Ser, F₁ er Ser, G₁ er Asn, H₁ er Leu, I₁ er Val, J₁ er Pro og K₁ er Asn da er en eller flere A₁ til K₁ en D-aminosyre og Z er valgt fra gruppen som omfatter alkyl-

amino, dialkylamino, cykloalkylamino, arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller aralkyloksy.

4. Anvendelse som angitt i krav 1, hvor nevnte amylin-
 5 agonist har den etterfølgende aminosyresekvensen:
 1A_1 -X-Asn-Thr- 5 Ala-Thr-Y-Ala-Thr- 10 Gln-Arg-Leu- B_1 -Asn- 15 Phe-
 Leu- C_1 - D_1 - E_1 - 20 F $_1$ - G_1 -Asn- H_1 -Gly- 25 Pro-I $_1$ -Leu-J $_1$ -Pro- 30 Thr-K $_1$ -
 Val-Gly-Ser- 35 Asn-Thr-Tyr-Z

hvor

10 A_1 er Lys, Ala, Ser eller hydrogen;

B_1 er Ala, Ser eller Thr;

C_1 er Val, Leu eller Ile;

D_1 er His eller Arg;

E_1 er Ser eller Thr;

15 F_1 er Ser, Thr, Gln eller Asn;

G_1 er Asn, Gln eller His;

H_1 er Phe, Leu eller Tyr;

I $_1$ er Ile, Val, Ala eller Leu;

J $_1$ er Ser, Pro, Leu, Ile eller Thr;

20 K $_1$ er Asn, Asp eller Gln;

X og Y er uavhengig av hverandre valgt fra rester med side-
 kjeder som er kjemisk bundet til hverandre for å danne en
 intramolekylær binding, hvor nevnte intramolekylære binding
 omfatter en disulfidbinding, en laktam- eller en tioeter-
 25 binding, og Z er amino, alkylamino, dialkylamino, cykloalkyl-
 amino, arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller
 aralkyloksy, og med den betingelse at når

(a) A_1 er Lys, B_1 er Ala, C_1 er Val, D_1 er Arg, E_1 er Ser,
 F_1 er Ser, G_1 er Asn, H_1 er Leu, I $_1$ er Val, J $_1$ er Pro
 30 og K $_1$ er Asn; eller

(b) A_1 er Lys, B_1 er Ala, C_1 er Val, D_1 er His, E_1 er Ser,
 F_1 er Asn, G_1 er Asn, H_1 er Leu, I $_1$ er Val, J $_1$ er Ser
 og K $_1$ er Asn;

da er en eller flere av A_1 til K $_1$ en D-aminosyre og Z er valgt
 35 fra gruppen som omfatter alkylamino, dialkylamino, cyklo-
 alkylamino, arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy
 eller aralkyloksy.

5. Anvendelse som angitt i krav 1, hvor nevnte amylin-agonist har den etterfølgende aminosyresekvensen:

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-
5 Val-Gly-Ser-³⁵Asn-Thr-Tyr-Z

hvor

A₁ er Lys, Ala, Ser eller hydrogen;

B₁ er Ala, Ser eller Thr;

C₁ er Val, Leu eller Ile;

10 D₁ er His eller Arg;

E₁ er Ser eller Thr;

F₁ er Ser, Thr, Gln eller Asn;

G₁ er Asn, Gln eller His;

H₁ er Phe, Leu eller Tyr;

15 I₁ er Ala eller Pro;

J₁ er Ile, Val, Ala eller Leu;

K₁ er Asn, Asp eller Gln;

X og Y er uavhengig av hverandre valgte rester med sidekjeder som er kjemisk bundet til hverandre for å danne en intramolekylær binding, hvor nevnte intramolekylære binding omfatter en disulfidbinding, en laktam- eller en tioeterbinding, og Z er amino, alkylamino, dialkylamino, cykloalkylamino, arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller aralkyloksy, og med den betingelse at når A₁ er Lys, B₁ er Ala, C₁ er Val, D₁ er Arg, E₁ er Ser, F₁ er Ser, G₁ er Asn, H₁ er Leu, I₁ er Pro, J₁ er Val og K₁ er Asn, da er en eller flere av A₁ til K₁ en D-aminosyre og Z er valgt fra gruppen som omfatter alkylamino, dialkylamino, cykloalkylamino, arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller aralkyloksy.

30

6. Anvendelse som angitt i krav 1, hvor nevnte amylin-agonist har den etterfølgende aminosyresekvensen:

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

hvor

A₁ er Lys, Ala, Ser eller hydrogen;

B₁ er Ala, Ser eller Thr;

C₁ er Val, Leu eller Ile;

D₁ er His eller Arg;

E₁ er Ser eller Thr;

F₁ er Ser, Thr, Gln eller Asn;

G₁ er Asn, Gln eller His;

5 H₁ er Phe, Leu eller Tyr;

I₁ er Ile, Val, Ala eller Leu;

J₁ er Asn, Asp eller Gln;

X og Y er uavhengig av hverandre valgte rester med sidekjeder som er kjemisk bundet til hverandre for å danne en intramole-
 10 kylær binding, hvor nevnte intramolekylære binding omfatter en disulfidbinding, en laktam- eller en tioeterbinding, og Z er amino, alkylamino, dialkylamino, cykloalkylamino, aryl- amino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller aralkyloksy, og med den betingelse at når A₁ er Lys, B₁ er Ala, C₁ er Val,
 15 D₁ er Arg, E₁ er Ser, F₁ er Ser, G₁ er Asn, H₁ er Leu, I₁ er Val og J₁ er Asn, da er en eller flere av A₁ til J₁ en D- aminosyre og Z er valgt fra gruppen som omfatter alkylamino, dialkylamino, cykloalkylamino, arylamino, aralkylamino, alkyloksy, aryloksy eller aralkyloksy.

20

7. Anvendelse som angitt i krav 1-6, hvor det medisinske middel er utformet for administrering fra 1 til 4 ganger pr. døgn.

25

8. Anvendelse som angitt i krav 1-7, hvor det medisinske middel er utformet til å avlevere amylin eller amylinagonist i en mengde på omtrent 2,5 µg til omtrent 5 mg pr. dose.

30

9. Anvendelse som angitt i krav 1-7, hvor det medisinske middel er utformet til å avlevere amylin eller amylinagonist i en mengde på omtrent 10 µg til omtrent 1,25 mg pr. dose.

35

10. Anvendelse som angitt i krav 1-9, hvor det medisinske middel er utformet til å avlevere amylin eller amylinagonist- en i en mengde på 30 µg til 300 µg pr. dose.

11. Anvendelse som angitt i krav 1-10, hvor amylinagonisten er ^{25,28,29}Pro-h-amylin.

12. Anvendelse som angitt i krav 1-11, hvor mennesket har en kroppsmasseindeks på minst 27,0 kg/m².