



HU000229042B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **229 042**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 02 04459**(22) A bejelentés napja: **2001. 04. 02.**(40) A közzététel napja: **2003. 05. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 07. 29.**(51) Int. Cl.: **A61P 3/10** (2006.01)**A61K 314/25** (2006.01)**A61K 38/00** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/EP 01/03725

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0172290

(30) Elsőbbségi adatok:

60/194,061**2000. 03. 31.****US**

(73) Jogosult(ak):

Prosidion Limited, Oxford, Oxfordshire (GB)

(72) Feltaláló(k):

Demuth, Hans-Ulrich, Halle/Saale (DE)**Glund, Konrad, Halle/Saale (DE)**

(74) Képviselő:

**Kovári György, ADVOPATENT Szabadalmi és
Védjegy Iroda, Budapest**(54) **Eljárás szigetek (Langerhans-szigetek) jeladásának a javítására cukorbetegségben, valamint annak megelőzésére**

(57) Kivonat

A találmány eljárást közöl emlőszálatok terápiás kezelésére, közöttük emberek kezelésére is (ami azonban nem jelent korlátozást) olyan módon, hogy az endogén hasnyálmirigy béta-sejtek relatív inzulintermelő teljesítményét növelik, és a hasnyálmirigy epiteliális sejtjeinek inzulintermelő béta-sejtekké végbemenő differenciálódását kiváltják. A DPIV-gátló orális adagolása a GLP-1 aktív formájához vezet, amely fiziológiai körülmények között hosszabb ideig tartóssá tehető. A GLP-1 meghosszabbított jelenléte - különösen hasnyálmirigyszövetben - megkönnyíti a már jelenlévő sejtek differenciálódását β -sejtekké és regenerálódását, mivel ezeknek a sejteknek regenerálódásra van szükségük. Ezek a regenerált inzulintermelő sejtek hozzájárulhatnak a normális, fiziológiai glikémiás szintek korrekciójához és fenntartásához.

**ELJÁRÁS SZIGETEK (LANGERHANS-SZIGETEK)
JELADÁSÁNAK A JAVÍTÁSÁRA CUKORBETEGSÉGBEN,
MEGADÁS ALAPJÁUL VALAMINT ANNAK MEGELŐZÉSÉRE
SZOLGÁLÓ VÁLIÓZAT**

Szabadalmi leírás

A hasnyálmirigy (pankreász) kétféle mirigyszövetből áll: az egyik azoknak a sejteknek a csoportja, amelyek a hasnyálmirigy külső elválasztású (exokrin) működését végzik, aminek során ezek az exokrin sejtek emésztőenzimeket szintetizálnak, és azokat a vékonybélbe szabadítják fel; a második fajta szövet végzi a hasnyálmirigy belső elválasztású (endokrin) működését, ezek a sejtek hormonokat szintetizálnak, és azokat a vérkeringésbe szabadítják fel. A hasnyálmirigy endokrin működésében elsődleges fontossággal bírnak a β -sejtek. Ezek a sejtek szintetizálják és elválasztják az inzulin hormont. Az inzulin hormonnak életfontosságú szerepe van a normális, fiziológias vércukorszintek (glikémiás szintek) fenntartásában. Vannak olyan molekulák, amelyek a hasnyálmirigy endokrin sejtjeinek az effektorai (végrehajtó egységei). Az ilyen molekulák egy példáját képviselik az inkretinek. Az inkretinek az inzulinnak glükózzal indukált, hasnyálmirigyből végbemenő elválasztását fokozzák (potenciózzák).

Igazolták, hogy inkretinek - így például a glukagon-szerű peptid-1-(7-36)-amid ("GLP-1" vagy a "gyík"-analóg Exendin-4), valamint a gyomorban lévő gátló polipeptid ("GIP") inzulinotróp hatásúak, azaz jelenlétük vagy stabilizálódásuk inzulin-elválasztású hatásai útján fenntarthatja az akut glikémiás szabályzást (Demuth, H.U., et al., DE 196 16 486:1-6, 1996; Pauly, R.P. et al., Regul. Pept. 64 (1-3): 148, 1996, amelynek

kitanításait leírásunkban hivatkozásként teljes egészében befoglaljuk). Továbbá kimutatták, hogy a GLP-1 szigetszaporító (a szigetsejtek szaporodását elősegítő) hormonként hat, a β -sejtek szaporodásának serkentése, a sejttömeg növekedése útján és azáltal, hogy elősegíti a nem-differenciált pankreászsejteknek a Langerhans-sziget specializált sejtjeivé való átalakulását. Az ilyen sejtek inzulin- és glukagonelválasztása javul (Yaekura, K. et al., IN: VIP, PACAP, and Related Peptides, W.G. Forssmann and S.I. Said (eds.), New York: New York Academy of Sciences, 1998, p. 445-450; Buteau, J. et al., *Diabetologia* 42(7): 856-864, 1999, amelynek kitanításait leírásunkban hivatkozásként teljes egészében befoglaljuk).

Előzőleg már javasolták az exogén bioaktív GLP-1 peptid vagy analógjainak alkalmazását a szigetsejtek regenerálásának in vivo serkentésére; vagy hasnyálmirigysejtek kivételét cukorbetegékből és az ilyen sejtek kezelését ex vivo körülmények között szövettényészetben bioaktív GLP-1 alkalmazásával. Úgy tekintették, hogy ez az ex vivo kezelés megkönnyíti a szigetsejtek regenerálódását és/vagy differenciálódását, s így ezek a szigetsejtek inzulint vagy glukagont képesek szintetizálni és elválasztani (Zhou, J. et al., *Diabetes*, 48(12):2358-2366, 1999; Xu, G. et al., *Diabetes*, 48(12):2270-2276, 1999, amelynek kitanításait leírásunkban hivatkozásként teljes egészében befoglaljuk).

Ez a kezelési rend azonban bioaktív GLP-1 enterális vagy parenterális alkalmazását igényli olyan betegeken, akiken esetleg műtétet kell végezni. A találmány egyik szempontját jelenti a sebészi kezelés szükségességének az elhárítása bioaktív GLP-1-amid enterális vagy parenterális alkalmazása útján.

A következőkben találmányunkat röviden összefoglaljuk.

A találmány új eljárásra (módszerre) vonatkozik, amelynek eredményeként a dipeptidilpeptidáz (DPIV vagy CD 26) enzim aktivitásának vagy DPIV-szerű enzimaktivitásának a csökkenése emlőszállatok vérében az enzim effektorai által indukálva oksági következményként a gasztrointesztinális polipeptid glukagon-szerű peptid-amid-1 7-36 (GLP-1₇₋₃₆), (vagy ennek a peptidnek szerkezetileg rokon funkcionális analógjai, így a GLP-1₇₋₃₇; vagy a GLP-1₇₋₃₆ csonkított, azonban biológiailag aktív fragmentumai) csökkent bomlást szenvednek a DPIV és DPIV-szerű enzimek hatására. Ennek a kezelésnek a hatására a keringő peptidhormonok és analógjaik funkcionálisan aktív GLP-1 (beleértve a GLP-1-ből származó anyagokat is) koncentrációjának csökkenése kisebb lesz vagy késlekedik.

Az endogén GLP-1 DPIV aktivitás gátlásával kiváltott megnövekedett stabilitásának következményeként (beleértve a GLP-1 származékait is) a keringő peptidok GLP-1 aktivitása meghosszabbodik, és így funkcionálisan aktív GLP-1 (beleértve GLP-1 származék) keringő peptidhormont eredményez, amely a hasnyálmirigy sejtek szaporodási hormonszerű stimulálását megkönnyíti olyan módon, hogy ezek a sejtek a Langerhans-szigetek funkcionálisan aktív sejtjeivé szaporodnak. Ehhez járul, hogy az érzéketlen pankreászsejtek vagy nem párosult pankreászsejtek a Langerhans-szigetek funkcionálisan aktív sejtjeivé alakíthatók, ha azokat GLP-1 hatása alá helyezzük.

Várható volt, hogy érzéketlen vagy nem párosult pankreászsejtek funkcionálisan aktív Langerhans-szigetsejteké alakítása növekedő inzulinválasztást eredményez, valamint az inzulinszintet a vérplazmában növeli. Meglepő módon egészséges,

illetve elhízott önkéntes embereken végzett vizsgálatokban, valamint elhízott, cukorbeteg patkányokon az inzulinszint a DPIV-gátló izoleuciltiazolidin-hemifumarát (P32/98) anyaggal végzett kezelés után csökkent (lásd az 1., illetve 2. példákat). Továbbá a Langerhans-szigetek ezt követő regenerálódása megváltoztatja az endogén inzulin és más szigethormon, így a glukagon hatékonyságát olyan módon, hogy egy kezelt állat szénhidrát-metabolizmusának a stimulálása elérhető. Ennek eredményeként a vér glükózkonzentrációja a hiperglikémiára jellemző glükózkonzentráció alá esik, amint ez az 1. és 2. példákban látható. Részleteiben nem ismert az a mechanizmus, amelynek útján ezek a hatások jelentkeznek. Ezzel szemben a szigetsejteknek így kialakult regenerálódása továbbra is anomáliákat idéz elő a metabolizmusban: ilyenek például a glikozurea, hiperlipidémia, valamint a súlyos metabolikus acidózis és a cukorbetegség (diabetes mellitus). A találmány szerinti eljárással ezek a szövődmények megelőzhetők vagy enyhíthetők.

Ellentétben más, a szakterületen ismert, javasolt módszerekkel, amilyen például a hasnyálmirigysejtek vagy szövet átültetése, vagy a hasnyálmirigysejtek ex vivo kezelése GLP-1 vagy exendin-4-vel és ezt követően a kezelt sejtek ismételt beültetésével, a találmány nem igényel bonyolult és költséges sebészi eljárást, és lehetőséget nyújt az orálisan végzett terápiára. A találmány új megközelítést jelent a vércukor megnövekedett koncentrációjának a csökkentésére. A találmány ipari szempontból hasznos, és terápiás rend keretében alkalmazható, különösen az emberi betegség kezelésére, különösen olyan emberi betegségek kezelésére, amelyeket a tartósan megnövekedett vércukorszintek idézhetnek elő.

A következőkben rövid magyarázatot fűzünk a rajzokhoz.

Az 1. ábra a keringő bioaktív GLP-1 időtől való függését mutatja embereken ($n = 36$), függésben az orálisan adagolt P32/98 DPIV-gátló összetételtől.

A 2. ábra grafikon, amely a keringő bioaktív GLP-1 AUC értékének a függését mutatja a P32/98 DPIV-gátló orálisan alkalmazott összetételtől.

A 3. ábra grafikus ábrázolás, amely mutatja a reggeli vérglükóz (MBG) értékének javulását $8,7 \text{ mg/kg/nap}$ P32/98 szubkrónikus monoterápiás adagolása után elhízott, diabeteses fa/fa patkányokon.

A 4a. ábra grafikus ábrázolás: mutatja a glükóz szabályzásának javulását annak eredményeként, hogy elhízott cukorbeteg patkányokat GPIV-gátlóval kezeltünk a kezelés után 16 napig.

A 4b. ábra grafikus ábrázolás, amely mutatja az elhízott, cukorbeteg patkányokon végzett 16 napos kezelés utáni értékeket DPIV-gátló következtében és az ennek tulajdonítható csökkenést az inzulin elválasztásában.

Az 5a ábra grafikus ábrázolás, amely mutatja a vérglükózszinteket az idő függvényében a javított glikémia fenntartásában, elhízott, diabeteses fa/fa patkányokon a P32/98 DPIV-gátló készítménnyel végzett 21 napos szubkrónikus kezelés után.

Az 5b. ábra grafikus ábrázolás, amely mutatja a plazma inzulinszintjeit az idő függvényében javított glükémia fenntartásában a formulált DPIV-gátló P32/98 anyaggal végzett 21 napos szubkrónikus kezelés után elhízott, diabeteses fa/fa patkányokon.

Az alábbiakban a találmányt részletesen leírjuk.

A találmány új eljárást jelent hasnyálmirigysejtek differenciálására és/vagy visszaállítására (rekonstituálására). Így a Langerhans-szigetsejtek így végzett regenerálása pozitívan érinti az endogén inzulin- és más szigethormonok - így a glukagon - szintézisét és felszabadulását - olyan módon, hogy a szénhidrát-metabolizmus serkentését elérjük.

A glükózzal kiváltott inzulinelválasztást több hormon és neurotranszmitter (ingerületátvivő) anyag módosítja. Ezek közül különös jelentőséggel bír két bélhormon: a glukagon-szerű peptid-1 (GLP-1) és a gyomor gátló peptidje (GIP), ez a kettő egyaránt inzulinotróp hatóanyag. Az inzulinotróp hatóanyagok az inzulin hormon szintézisét serkenthetik, vagy a hormon szintézisét vagy expresszióját kiválthatják.

A GLP-1 hatásos, bélben található inzulinotróp anyag, amely az inzulin elválasztását fokozza, és akut módon csökkenti a glükózkonzentrációt, beleértve az I típusú és II típusú diabetes során megfigyelt szinteket. GLP-1 alternatív szövetspecifikus hasadások útján alakul ki a bél L sejtjeiben, a hasnyálmirigy endokrin β -sejtjeiben, valamint az agyi neuronokban. A GIP a duodénumban szintetizálódik és szabadul fel, valamint reggeli után a jejunum legközelebbi részében. Felszabadulása több tényezőtől függ, így például a táplálék tartalmától és az előzőleg fennálló egészségi állapottól. Felfedezése után gyomorsavgátló sajátosságairól nevezték el. Ahogy azonban ennek a hormonnak a kutatása előrehaladt, ennél fontosabb fiziológiai szerepét derítették fel. A GIP különösen inzulinotróp hatóanyag, amely stimuláló hatással rendelkezik az inzulin szintézisében és felszabadulásában.

A DPPIV exopeptidáz jellegű enzim, amely szelektíven hasítja azokat a peptideket, amelyek utolsó előtti N-terminális prolin- és alaninmaradékok után helyezkednek el. Ennek az enzimnek a számára endogén szubsztátumok például az inkretinek, így a glükóz-függő inzulinotróp polipeptidek, mint a GIP és GLP-1. DPPIV jelenlétében ezek a hormonok enzimes úton inaktív formákká redukálódnak. A GIP és GLP inaktív alakja nem képes inzulinelválasztás kiváltására. Ennek következtében a vér glükózsintjei főként a hiperglikémiás állapotban növekednek. A megnövekedett vérglükózsinteket számos különböző kóros állapottal hozták kapcsolatba (például az I. és II. típusú diabetes mellitus-szal), valamint a cukorbetegséget kísérő szövődeményekkel.

Felfedezték továbbá, hogy a DPPIV szerepet játszik a T-sejtekkel közvetített immunválaszokban, például átültetésekben. A DPPIV gátlásáról igazolták, hogy az átültetett szívszövetek élettartamát meghosszabbítja. Továbbá igazolták, hogy a DPPIV gátlása a reumatoid ízületi gyulladás elnyomásában szerepet játszhat. A DPPIV-nek továbbá szerepet tulajdonítottak a HIV T-sejtekbe való behatolásában (T-segítősejtek).

Kidolgoztak olyan hatóanyagokat, mint az N-(N'-szubsztituált glicil)-2-cianopirrolidinek, L-treo-izoleucilpirrolidin, amelyek a DPPIV enzimaktivitását gátolják; ezek leírása megtalálható az US 6,001,155, WO 99/61431, WO 99/67278, WO 99/67279, DE 198 34 591, WO 97/40832, DE 196 16 486 C 2, WO 98/19998, WO 00/07617, WO 99/38501 és WO 99/46272 számú szabadalmi dokumentumokban, amelyek információit hivatkozásként teljes egészükben foglaljuk leírásunkba. Ezeknek a hatóanyagoknak a célja a DPPIV gátlása, és ezen az úton a vérglükózsintek

(vérglükózkoncentrációk) hatásos csökkentése a hiperglikémia (túlságosan magas vércukorszint) és az ezzel együttjáró betegségek hatásos kezelésére, amelyek a vér megnövekedett glükózsztintjeivel járnak együtt. Meglepő módon felismertük, hogy ezek a hatóanyagok előnyösen alkalmazhatók egy teljesen különböző terápiás célra, eltérően mindattól, amely a szakterületen jártas személyek számára előzőleg ismert volt.

A találmány tárgya valamely DP IV enzim aktivitás inhibitor, diabétesz mellitusnak emlősökben történő megelőzésére.

A találmány tárgya továbbá valamely DP IV enzim aktivitás inhibitor felhasználása diabétesznek emlősökben történő megelőzésére alkalmas gyógyszer előállítására.

Olyan betegségek, amelyek jellemző módon hiperglikémiával járnak, például a diabetes mellitus I és II típusa. A diabetes általában úgy jellemezhető, mint a hasnyálmirigy β -sejtjeinek elégtelen hormontermelése. Normális körülmények között ezek a sejtek az inzulin hormont szintetizálják és elválasztják. Az I típusú diabetesben az elégtelenség a béta-sejtek autoimmun folyamat következtében fellépő bomlása. A II típusú diabetes főként a béta-sejt hiányossága és a perifériás inzulinrezisztencia kombinációjának a következménye. A diabetes-ben szenvedő betegben a béta-sejtek száma csökken olyanannyira, hogy versengés áll fenn a béta-sejtek képességére vonatkozóan a fiziológiai inzulin szintetizálása és felszabadítása szempontjából; továbbá azonban versengés áll fenn ezen inzulintermelő pankreászsejtek kritikus tömegének a szempontjából is. Ismert, hogy a diabetes fellépésekor a béta-sejtekben veszteség lép fel. Ezeknek az inzulintermelő sejteknek az elvesztése következtében feszültség áll be a pankreász endokrin funkciójában például az

inzulintermelés szempontjából. Az inzulintermelés vesztesége következtében a hiperglikémiának tulajdonítható kóros folyamatok kiéleződnek.

A GLP-1 a szigetsejtek szaporodási hormonjaként hatásos a béta-sejtek szaporodásának serkentésével, a sejttömeg növekedésével, valamint a nem differenciált pankreászsejteknek Langerhans-szigetek speciális sejtjeibe való átmenetének az elősegítésével. Ezek a GLP-1-nek a hatása alá tartozó pankreászsejtek az inzulin elválasztását, és a glukagon elválasztását is javítják (Yaekura, K. et al., IN: VIP, PACAP, and Related Peptides, W.G. Forssmann and S.I. Said (eds.), New York: New York Academy of Sciences, 1998, p. 445-450; Buteau, J. et al., *Diabetologia* 42(7): 856-864, 1999). Felismertük, hogy kívánatos a GLP-1 felezési idejének a hosszabbítása azzal a céllal, hogy ezáltal a pankreász béta-sejtjeinek a rekonstituálását (visszaállítást) megkönnyítsük. Továbbá módszert ismertünk fel, amelynek segítségével a GLP-1 katabolizmusa csökkenthető azzal a céllal, hogy a hasnyálmirigysejtek rekonstituálását megjavítsuk.

A találmány szerinti eljárás (módszer) hiperglikémia kezelésére vonatkozik egy emlőszállaton (beleértve az embert is, azonban korlátozás nélkül), és abban áll, hogy a GLP-1 jelenlétét fokozzuk (potenciózzuk) a DPIV vagy ezzel rokon enzimaktivitások gátlásával az enzim valamilyen inhibitorának a felhasználása útján. Egy DPIV-gátló orális alkalmazása a legtöbb körülmény között előnyös lehet. A találmányban azonban az adagolás más útjait is figyelembe vesszük. A DPIV enzimaktivitás gátlásával a GLP-1 aktív alakjának a felezési ideje jelentős mértékben kiterjed, és fiziológiai körülmények között tartható. Az aktív GLP-1 hosszabbított jelenléte a hasnyálmirigyszövetben megkönnyíti a

pankreász-epitéliumsejtek differenciálódását pankreász-effektor-sejtekbe, ugyanúgy, mint az inzulint termelő béta-sejtek esetén. Továbbá a GLP-1 fiziológiai szempontból aktív jelenlétének megnyújtása a pankreáaszövetben megkönnyítheti azoknak a béta-sejteknek a regenerálódását, amelyek még jelen vannak, azonban javulásra van szükségük. Meglepő módon ez a hatás csak ismételt adagolás után figyelhető meg (lásd a 2. példát). Mivel az orvosi kezelés megvonása után a kezelés előtti metabolikus állapot visszaáll, a DPIV szubkrónikus vagy krónikus adagolása szükséges az elért, megjavult glükémia fenntartására. Ezek a javított, inzulintermelő sejtek azután hatékonyan hozzájárulhatnak a normális fiziológiai glikémiás szintek korrekciójához és fenntartásához.

A találmányban az endogén GLP-1-t szintetizáljuk, és ezek normális, fiziológiai úton szabadulnak fel. Táplálék felvétele a GLP-1 felszabadulását serkentheti. Egy más módon, glükóz vagy analógja orálisan adható gyógyászati szempontból elfogadható vívőanyagban (például „cukorpilulában”) az endogén GLP-1 felszabadulásának serkentése céljából. Az ilyen glükóz a DPIV gátlók előtt, azokkal egyidőben vagy adagolás után szedhetők.

A találmány továbbá gyógyászati készítményekre is kiterjed. Ezek a készítmények a gátló hatóanyag (és/vagy egy cukorpilula a DPIV-gátló adagolásának kísérésére) terápiásan (vagy profilaktikusan) hatásos mennyiségű inhibitort és gyógyászati szempontból elfogadható vívőanyagot vagy segédanyagot tartalmazhatnak. A vívőanyagot és a készítményt (összetételt) kedvező laboratóriumi gyakorlat körülményei között állítjuk elő, steril állapotban. A formulát ideális értelemben úgy választjuk

meg, hogy ez az adagolás módjának megfelelő legyen az általános gyakorlat szerint.

A célszerű, gyógyászati szempontból elfogadható vívóanyagok például (azonban korlátozás nélkül): víz, sóoldatok (például konyhasóoldat), alkoholok, arabmézga, növényi olajok, benzil-alkoholok, polietilén-glikolok, zselatin, szénhidrát, így például laktóz, amilóz vagy keményítő, magnézium-sztearát, talkum, viszkózis paraffinolaj, parfümolaj, zsírsav-észterek, (hidroximetil)cellulóz, polivinilpirrolidon. A gyógyászati készítmények sterilizálhatók, és kívánt esetben segédanyagokkal - például gördülékenységet fokozó szerekkel, tartósítószerrel, stabilizáló-, nedvesítő-, emulgeálószerrel keverhetők - , az ozmózisnyomás befolyásolására sókat, továbbá pufferokat, színezékeket, ízesítőket és/vagy aromatiszt anyagokat tartalmazhatnak, amelyek az aktív vegyületekkel károsan nem reagálnak, azonban a stabilitást, a gyárthatóságot javítják és/vagy a termék esztétikus megjelenését biztosítják.

Kívánt esetben a készítmények csekély mennyiségben nedvesítő- vagy emulgeálószerrel, valamint pH-szabályzó pufferanyagokat tartalmazhatnak. Továbbá a készítmény lehet folyékony oldat, szuszpenzió, emulzió, tabletta, pilula, kapszula, késleltetett felszabadulást biztosító összetétel vagy por. Továbbá a készítmény kialakítható végbélkúp alakjában is a hagyományos kötőanyagokkal és vívóanyagokkal együtt, amilyenek például a trigliceridek. Az orális összetételek közé tartozhatnak standard vívóanyagok, így például a gyógyszerészeti szempontból megfelelő mannit, laktóz, keményítő, magnézium-sztearát, polivinilpirrolidon, nátrium-szacharin, cellulóz és a magnézium-karbonát.

Továbbá a készítmény formulálható olyan módszerek szerint, amelyek a gyógyászati készítmények területén jól ismertek, és emberek számára, intravénás adagolás céljára adaptáltak. Az intravénás adagolásra alkalmazható készítmények általában steril izotóniás, vizes pufferoldatok, szükséges esetben a készítmény szolubilizálószerrel és helyi érzéstelenítőszerrel is tartalmazhat, hogy az injekció beadásának helyén fellépő fájdalomérzést enyhítse. A komponensek általában külön-külön vagy egymással keverve, például száraz, liofilizált por, vagy vízmentes koncentrátum alakjában tarthatók légmentesen elzárt tartóban, például ampullában vagy tasakban, amelyen a hatásos adag mennyisége fel van tüntetve. Ha a készítményt infúzió formájában kell adagolnunk, akkor az elosztható egy infúziós edényből, amely steril, gyógyszerészeti tisztaságú vizet, konyhasóoldatot vagy vizes dextrózoldatot tartalmaz. Ha a készítményt injekció útján adagoljuk, akkor tárolhatjuk egy steril vizet tartalmazó ampullával együtt, amely injekcióra vagy konyhasóoldatra alkalmas, és a komponenseket közvetlenül adagolás előtt keverjük össze.

Végül a találmány szerinti készítmények közömbös vagy sóalakban is formulálhatók. Gyógyászati szempontból elfogadható sók közé tartoznak például a szabad aminocsoportok sósavval, foszforsavval, ecetsavval, oxálsavval, borkósavval alkotott sói; valamint a nátrium-, kálium-, ammónium-, kalcium- vagy vas(III)-hidroxiddal alkotott sók; valamint az izopropil-aminnal, trietil-aminnal, 2-etilamino-etanollal, hisztidinnel vagy prokainnal alkotott sók; és egyéb sóformák, amelyek a szakterületen jól ismertek.

A találmány szerinti készítménynek az a mennyisége, amely egy adott betegség vagy kóros állapot kezelésében hatásos lehet, a

betegség vagy kóros állapot jellegétől függ, és standard klinikai eljárásokkal meghatározható. Továbbá in vitro és/vagy in vivo mérőmódszerek adott esetben felhasználhatók a legkedvezőbb adagolási tartomány kijelölésére. Az összetételben (formulában) alkalmazható pontos adag az adagolás útjától és a betegség vagy kóros állapot súlyosságától is függ. Az adagot a kezelő orvos megítélése szerint kell eldönteni minden egyes beteg körülményeinek figyelembe vételével.

PÉLDÁK

1. példa

A DPIV-gátló P32/98 a PepT1 bélben működő peptid-transzportáló anyag (transzporter anyag) útján aktívan transzportálódik. A P32/98 gyors és aktív transzportja a bél nyálkahártyán át hatásának gyors bekövetkezéséért felelős. A dipeptidilpeptidáz IV (DPIV) hatásos célzásának előfeltétele a t_{max} . A P32/98 orális adagolása a bevétel után patkányon 15-20 perc múlva, illetve emberen 30-40 perc múlva éri el a célzott maximális gátlást. Ennek alapján a DPIV-gátló anyagot a glükóz vagy a táplálék felvétele után 10-20 perccel kell adagolni.

Az első, emberen végzett vizsgálatban – amelyet P32/98-val végeztünk – farmakodinamiás paramétereket, így a plazma inzulinkoncentrációját és GLP-1 koncentrációját, továbbá a vér glükózsintjét vizsgáltuk 36 egészséges önkéntes férfiakon. A P32/98-at orálisan adagoltuk a következő koncentrációkban: 7,5 mg, 15 mg, 30 mg, 60 mg, 120 mg, illetve 240 mg. A fentebb farmakodinamiás paraméterekkel kapcsolatban kapott

eredményeinket az alábbi I. táblázatban összegeztük (lásd később).

A 36 egészséges férfiegyént 3 csoportra osztottuk, amelyek mindegyikébe 12 egyént soroltunk. Minden egyes csoportban 9 egyén aktív P32/98 hatóanyagot, 3 egyén placebót kapott. A gyógyszerhatóanyaggal kezelt egyének számára kétszer adagoltunk, különböző periódusokban, különböző koncentrációkkal. A P32/98 koncentrációi a csoportokon belül a következőképpen alakultak: az I. csoport 7,5 mg-ot, illetve 60 mg-ot kapott; a II. csoport 15 mg-ot, illetve 120 mg-ot kapott, és a III. csoport 30 mg-ot, illetve 240 mg-ot kapott. Mindegyik csoportban azok az egyének, akik placebót kaptak, mind a két adagolási intervallumban placebót szedtek.

A vizsgálatban való részvételük előtt 3-14 napon belül a vizsgálati egyéneket elővizsgálatnak vetettük alá. A vizsgálat második szakasza egy kísérleti fázisból (vizsgálati fázisból), valamint hat, egyszeri dózissal végzett kezelésből állt, amelyek a P32/98 emelkedő koncentrációit tartalmazták (1.-6. időszakok; lásd a 2. táblázatot), amelyet egy közvetlenül utána végzett vizsgálattal zártunk le. Valamennyi vizsgálati egyén részt vett az elővizsgálatban és a kísérleti fázisban, amelyeket legalább 5 napos kimosási fázissal különítettünk el. A rákövetkező vizsgálatot legalább 7 nappal a hatóanyagvizsgálat utolsó adagolása után végeztük. A vizsgálati eljárás mind a hat periódusban azonos volt, a vizsgálat alatt álló adag kivételével.

Módszerek

Orális glükóztolerancia-próba („OGTT”)

A vizsgálati egyéneket megkértük, hogy minden egyes OGTT előtt legalább 12 órával ne táplálkozzanak (éheztetés), és teljesítsék a szénhidrátban dús étrendet minden egyes OGTT előtt 3 nappal. Minden egyes glükóztolerancia-próba során a vizsgálati egyének 300 ml mono-/diszacharid-oldatot fogyasztottak, amely 75 g glükózzal egyenértékű (Dextro[®] O.G.T. Boehringer Mannheim, FRG). A vérmintákat (1,2 ml térfogatban nátrium-fluoridos kémcsövekben) közvetlenül a glükóz bevétele előtt, majd ezt követően 30, 60, 90, illetve 120 perccel a glükóz bevitele után gyűjtöttük. Bármely 126 mg/dl (7,00 mmol/l) fölötti glükózkonzentrációt 0 percnél és 120 percnél úgy tekintettünk, hogy az a glükóztolerancia patológiás állapotát jelenti.

Minden egyes adagolási időszak 1. napján nyújtott (kiterjesztett) OGTT-t végeztünk. A vizsgálati egyének 300 ml mono-/diszacharid-oldatot fogyasztottak, amely 75 g glükózzal egyenértékű. Az 1,2 ml térfogatú vérmintákat a következő intervallumokban gyűjtöttük: 1) 5 perccel a glükóz fogyasztása előtt; 2) a glükóz fogyasztása után 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, illetve 180 perccel; 3) a glükóz fogyasztása után 4, 12, 24, illetve 48 órával. Ezen felül további farmakodinamiás értékeléseket végeztünk, amelyek ezen a szakterületen jól ismertek.

Inzulin

4,7 ml vért vettünk 4,9 ml térfogatú EDTA csövekben. A mintákat 1500 g sebességgel 10 percig centrifugáltuk, majd a laboratóriumi elemzés időpontjáig -70 °C hőmérsékleten fagyasztva tároltuk.

Glükóz

1,2 ml vért gyűjtöttünk 1,2 ml-es nátrium-fluorid-csővekben. A plazmamintákat 1500 g sebességgel 10 percig centrifugáltuk,

majd a laboratóriumi elemzés időpontjáig -70°C hőmérsékleten fagyasztva tároltuk.

GLP-1

2,7 ml vért vettünk EDTA csővekben, jégre vagy hűtőszekrénybe helyeztük, és dipeptidilpeptidáz IV gátló anyagot adtunk hozzá. A gátló hatóanyagot előzőleg a kutatók állították elő. A vért kémcsővekben gyűjtöttük, majd közvetlenül utána 10 percig 1000 g sebességgel centrifugáltuk, vagy a vért helyeztük jégre, 1 órán belül centrifugáltuk, és egyenlő méretű mintákra (alíkvotokra) osztottuk. A vérnek megfelelő alíkvot mintákat -70°C hőmérsékleten tároltuk (azzal a céllal, hogy a többszörös fagyasztási/felolvasztási ciklust elkerüljük) a laboratóriumi elemzés időpontjáig.

Eredmények

Az aktív GLP-1 koncentrációk

Úgy találtuk, hogy a P32/98 hatása placebóval összehasonlítva dóziszfüggő. Valamennyi egyedi koncentráció a 2-68 pmol/l tartományban változott. A dózis előtti csoport átlagai $3,77 \pm 2,62$ pmol/l, illetve $6,67 \pm 9,43$ pmol/l értékeknek adódtak, és placebó alkalmazása után 4,22, illetve 7,66 pmol/l értékkel növekedtek; azonban gátló hatású anyag alkalmazása után 11,6 pmol/l (15 mg) és 15,99 pmol/l (240 mg P32/98) értékkel növekedtek. Ha a relatív átlagos növekedést az abszolút koncentrációkból értékeljük (számítjuk), akkor az aktív GLP-1 koncentrációk megközelítőleg 200-300 %-kal növekedtek placebós kezelés után, azonban megközelítőleg 300-400 %-kal növekedtek P32/98-val végzett kezelés után. A középértékek abszolút növekedése 15-240 mg P32/98 adagolása után a placebóval összehasonlítva 2-3-szor magasabb volt a 7,5 mg adagnál is (lásd

az 1. táblázatot) és nagyjából dózis-hatás (dózis-válasz) kapcsolatra utalt. Az adagolás előtti értékek növekedése megközelítőleg 3-4 órán át megmaradt a P32/98 adagolásához viszonyítva.

Inzulinkoncentrációk

Az inzulinkoncentrációk általában egyedi tartományban adódtak 3,40 és 155,1 $\mu\text{IU/ml}$ értékek között ($\mu\text{IU} = \text{NE}$, nemzetközi egység). Az átlagos ($\pm\text{SD}$) adagolás előtti koncentrációk $7,96 \pm 1,92 \mu\text{IU/ml}$ (30 mg) és $11,93 \pm 2,91 \mu\text{IU/ml}$ (60 mg P32/98) közötti tartományban váltakoztak. 75 g glükóz bevitelét követően 10 perccel P32/98/placebó dózis után az átlagos inzulinkoncentrációk 40-55 percen belül $30,12 \mu\text{IU/ml}$ (120 mg P32/98) és $56,92 \mu\text{IU/ml}$ (30 mg-os csoport) tartományban adódtak. Nem volt nyilvánvaló különbség a placebócsoportok és a P32/98-val adagolt csoportok között, és nem adódott bizonyíték a P32/98 dóziszfüggő hatására vonatkozóan. Érdekes módon az inzulinkoncentráció abszolút növekedése legkisebb volt a két legmagasabb mennyiséggel kezelt P32/98 csoportban (lásd az 1. táblázatot). Az inzulinkoncentrációk az összes vizsgálati csoportban (a placebót is beleértve) 3-4 órán át növekedtek.

Glükózkoncentrációk

A glükózkoncentrációk éheztetett állatokban 2,47 és 11,7 mmol/l tartományban adódtak az OGTT során vagy étkezés után valamennyi vizsgált egyénen. Az átlagos, adagolás előtti koncentrációk $4,55 \pm 0,41$ (15 mg) és $4,83 \pm 0,30$ mmol/l (7,5 mg P32/98) értékek szorosan egymás mellett adódtak, és csekély variációt mutattak. Az átlagos legnagyobb koncentrációkat az adagolás után 40-55 percen belül, azaz a 75 g glükóz adagolása után 30-45 percen belül érték el. Az abszolút átlagos

koncentrációk a két placebócsoportban és a 7,5 mg P32/98-val kezelt csoportban voltak a legmagasabbak. A legkisebb abszolút átlagértékeket a 15 mg-os, 60 mg-os és 240 mg-os adagolási csoportokban kaptuk. A megfelelő átlagos változások 3,44 és 4,21 mmol/l és (illetve) 1,71 - 3,41 mmol/l értékek között változtak, és szorosan megközelítették az 1. táblázatban közölt középértékeket. Jóllehet teljes dóziszfüggést nem figyeltünk meg, ezek az eredmények arra utalnak, hogy a placebóval összehasonlítva kisebb a glükózkoncentrációk növekedése, ha a P32/98 adagját 15 mg és 240 mg között növeljük.

1. táblázat

A farmakodinamiás paraméterek legnagyobb változásai

(0-12 órás középértékek)

	Placebo (1-3)	7.5mg P32/98	15mg P32/98	30mg P32/98	Placebo (4-6)	60mg P32/98	120mg P32/98	240mg P32/98
GLP-1, aktív [pmol/l]	3.90 0:25h	4.10 1:10h	10.00 0:25h	10.60 0:40h	5.30 0:40h	12.20 0:25h	11.10 0:25h	14.50 0:25h
Inzulin, [μU/ml]	46.29 0:55h	41.86 0:55h	29.67 0:55h	59.84 0:40h	42.90 0:40h	43.35 0:40h	28.63 0:40h	33.36 0:40h
Glükóz, [mmol/l]	3.43 0:55h	4.66 0:55h	2.43 0:55h	3.38 0:40h	5.33 0:55h	2.92 0:40h	2.39 0:40h	1.73 0:40h

2. táblázat

A glükózkoncentrációk korrigált C_{max} és AUC értékei

0-3 órával OGTT után

	AUC _{0-180 perc} /mmol* perc/l/			C _{max} [mmol]		
	Átlag±SD	Becsült érték ¹	95% - CI	Átlag±SD	Becsült érték ¹	95% - CI
1-3. periódusok						
Placebó	223.9±143.3			4.16±1.10		
7.5 mg P32/98	299.7±111.4	75.8	-48.1 – 199.7	4.94±1.58	0.78	-0.40 – 1.96
15 mg P32/98	130.9±125.2	-93.0	-216.9 – 30.9	2.92±1.10	-1.24*	-2.43 – -0.06
30 mg P32/98	116.1±134.0	-107.7	-231.6 – 16.2	3.26±1.07	-0.90	-2.08 – 0.28
4-6. periódusok						
Placebó	252.9±103.3			4.91±1.14		
60 mg P32/98	151.8±99.2	-101.1	-204.8 – 2.6	3.50±1.66	-1.41*	-2.66 – -0.17
120 mg P32/98	126.7±147.3	-126.1*	-229.6 – -23.4	3.09±1.47	-1.82**	-3.07 – -0.58
240 mg P32/98	24.7±66.6	-228.2***	-331.8 – -124.5	1.99±0.69	-2.92***	-4.16 – -1.68

¹ Az ANOVA és a placebo szerinti összehasonlítás eredményei

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

Az alapszint szerint korrigált átlagos glükóz-csúcskoncentrációk (C_{max}) csak a két placeboval és 7,5 mg P32/98-val kezelt csoportokban haladták meg a 4,0 mmol/l értéket. Ezek az értékek a 15 mg és 240 mg P32/98-val kezelt csoportokban is 3,0 mmol/l-nél kisebbek voltak. A placebo kezelésével összehasonlítva a különbség statisztikailag szignifikánsnak adódott a 15 mg, 60 mg, 120 mg és 240 mg P32/98-val kezelt csoportokban, azonban nem volt statisztikailag szignifikáns a 7,5 mg vagy 30 mg P32/98-val kezelt csoportokban. Az alapszint szerint korrigált átlagos AUC értékek 200 mmol*perc/l értéknél nagyobbak voltak placebo és 7,5 mg P32/98

adagolása után; azonban világosan észlelhető, hogy 200 mmol*perc/l-nél csekélyebbnek adódtak a 15 mg és 240 mg P32/98-as dóziscsoportokban. A szisztémás OGTT-ből származó glükózexpozíció statisztikailag szignifikáns volt a 15 mg, 60 mg, 120 mg és 240 mg P32/98-val kezelt csoportoknál, de nem volt statisztikailag szignifikáns a 7,5 mg és 30 mg-val kezelt dóziscsoportokban (lásd a 2. táblázatot). Az alapszint szerint korrigált értékek kiértékelése nagyon hasonló volt a korrigálatlan adatok értékeihez. Ennek alapján az adatok világosan csekélyebb glükózexpozícióra utaltak OGTT után P32/98-val kezelt egészséges egyéneken, ami megközelítő, de nem teljes dóziszfüggő indikációra mutat.

Következtetések

A fenti vizsgálat eredményei az alábbi farmakodinamiás következtetésre adnak alapot.

Az aktív GLP-1 megközelítőleg 300-400%-kal növekedett a soron következő P32/98-as kezelés után, 10 perccel OGTT előtt, azonban nem figyeltünk meg a placebo-kezeléstől megkülönböztethető hatást a 7,5 mg-os adagolási szint esetében (lásd az 1. és 2. ábrát). Úgy látszik, hogy a 75 g glükózzal kiváltott stimulálás után 120-140 mg dózis esetében az inzulinkoncentrációk csökkentek. Egészséges egyéneken végzett OGTT során a glükózkoncentrációk szignifikánsan kisebb növekedést mutattak P32/98 kezelés után (15-240 mg) a placeboval való összehasonlítás alapján, amit a P32/98 dóziséval hoztunk kapcsolatba.

2. példa

Az elhízott Zucker-patkányon a P32/98 tápláléktól függően elősegíti a kezdeti inzulinelválasztást. Ezzel szemben szubkrónikus

kezelés során a P32/98 csökkenti az összes napi inzulinelválasztást. Összehasonlítva kontrollként glibenklamiddal - amely az inzulin termelést 27 %-kal növeli - a P32/98 az inzulin gazdaságosabb kihasználását okozza 45% megtakarítással a kontrollal való összehasonlításban.

Tervbe vettük annak meghatározását, hogy P32/98 az első jelölt a glükóztolerancia in vivo befolyásolására olyan módon, hogy növeli a GIP és GLP-1 inkretinek keringési félidejét. Összehasonlító vizsgálatokat végeztek glibenklamiddal (Maninil[®] Berlin-Chemie, Berlin, Németország), mint összehasonlító anyaggal. A glibenklamid egyike a leghatásosabb vércukorcsökkentő hatóanyagoknak a 2. típusú cukorbetegek számára, és egyike a leggyakrabban felírt szulfonilkarbamidoknak.

A hím fa/fa patkányokat, amelyek glükózmétabolizmusokban abnormalitásokat mutatnak, és a 2. típusú diabetes jól megalapozott állatmodelljeinek tekinthetők - a következőképpen vizsgáltuk:

A P32/98-at és a glibenklamidot naponta egyszer adagoltuk a táplálék elfogyasztása előtt 21 napos időszakon át. Paraméterekként monitoroztuk a reggeli vérglükózszintet és a plazma inzulinszintjeit. Nappali-éjszakai profilban figyeltük a glikémiát és az inzulinémiát a 16. naptól a 17. napig. Végül a 21. napon egy OGTT-t végeztünk azzal a céllal, hogy a vérglükóz és a plazma-inzulin kinetikáját monitorozzuk, és a glükóztolerancia változásait értékeljük. A glibenklamidot (DAB 1996; R011150/33372) a Berlin-Chemie cég bocsátotta rendelkezésünkre, a hím Zucker (fa/fa) patkányokat a 300 g-os testtömegcsoportból kaptuk a Charles River cégtől (Sulzfeld, Németország).

Módszerek

Elhelyezési körülmények

Az állatokat egyesével helyeztük el a szokásos körülmények között szabályzott hőmérsékleten (22 ± 2 °C) egy 12/12 órás sötét/világos ciklussal (a világítást hajnali 6 órakor kezdtük meg). Az állatok számára a standard pelletet (ssniff[®], Soest, Németország) és sósavval savanyított csapvíz (vezetéki víz) fogyasztását tetszés szerint engedjük.

A karotisz artéria katéterezése

Egy hetes adaptálási periódus után a karotisz-katétereket altatás közben ültettük patkányokba (0,25 ml/kg i.p. Rompun[®]-nal (2%), Bayer, Németország készült injekciót adtunk) és 0,5 ml/kg i.p. Velonalkont alkalmaztunk (Arzneimittelwerk Dresden, Németország). Az állatokat egy héten át gyógyulni hagytuk; a katétert háromszor egy héten 100 NE/ml heparin-konyhasóoldattal öblítettük.

Ismételt adagolás

30 nem-diabetesez hím Wistar patkányt és 30 hím diabetesez Zucker patkányt RP szemben randomizáltunk (összehasonlító termék: glibenklamid)-, TP- (tesztanyag P32/98) és CO- (kontrollcsoportban csoportonként $n = 10$). Ezt követően a nem-cukorbeteg Wistar patkányokat orálisan kezeltük naponta egyszer RP-val (5 mg/kg) vagy TP-val (21,61 mg/kg) és a cukorbeteg Zucker patkányokat naponta egyszer orálisan RP-val (1 mg/kg) vagy TP-val (21,61 mg/kg) 21 napig hajnali 5,00 órakor (mielőtt a szokásos ételmet sötét fázisban bevették). A kontrollokknak orálisan 5 ml/kg 1%-os cellulózoldatot adtunk. A vérmintákat minden reggel 7 óra 30 perckor vettük a farokvénákból a vérglükóz koncentrációjának és a plazma-

inzulinnak a mérése céljából. A programnak ebben a részében az utolsó vérmintákat délelőtt 7,30 perckor vettük a 15. napon a vérglükóz-tartalom és a plazma-inzulin mérésére. Az orális gyógyszerterápiát egy hétig végeztük. Feljegyeztük a nappali-éjjeli profilt, és ezért a fenti terápiában a vér glükóztartalmát ($\Delta t = 3$ óra) és plazmainzulint ($\Delta t = 3-6$ óra) a 16. naptól kezdve monitoroztuk délután 5 óra kezdettel a 17. napig (délután 2 órakor a kísérletet befejeztük).

OGTT

Végső OGTT-t végeztünk a 21. napon a farokvénából vett vénán. A farokvénából a vérmintákat - 12 óránál (a 21 nap előtti éjszakán), 0 percnél (közvetlenül az OGTT megkezdése előtt) 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 és 120 perccel vettük. A vérmintákat 20 μ l térfogatú üvegapillárisokban vettük ki a vér glükóztartalmának mérése céljából, és Eppendorf kémcsövekben 100 μ l térfogatban. Ezt utóbbit közvetlenül utána centrifugáltuk, és a plazmafrakciókat -20°C hőmérsékleten tároltuk az inzulin elemzésének céljára.

A vér glükóztartalma

A glükózkonzentrációkat a glükóz-oxidáz eljárás alkalmazásával mértük (Super G Glukosemessgerát, Dr. Müller Gerätebau, Freital, Németország).

Plazma-inzulin

Az inzulinkonzentrációkat az RIA antitest módszerrel mértük (LINCO Research, Inc. St. Charles, MO, USA).

Eredmények

A glükémia éjjeli-nappali profilja (lásd a 4a. ábrát)

A CO-csoportban a 16. napon az átlagos vérglükózkonzentráció $7,78 \pm 0,83$ mmol/l értékű volt délután 5 órakor a hatóanyag alkalmazása előtt. Orális placebo bevétele és ételmyszerfelvétel után a glikémia a $12,18 \pm 1,34$ mmol/l maximális értékre növekedett 11,00 órára (este), ezt követően a glikémia igen lassan csökkent $7,27 \pm 0,61$ mmol/l értékre délelőtt 11 órára, majd ezt követte egy növekedés $8,90 \pm 0,92$ mmol/l értékre délután 2,00 órára a következő napon. Az RP csoportban a glikémiának ugyanilyen alakulását figyeltük meg. Azonban a $7,96 \pm 1,13$ mmol/l összehasonlító átlagértékből (délután 5,00 órakor) a kontrollállatokkal összehasonlítva megfigyeltünk egy erőlyesebb növekedést $14,80 \pm 1,46$ mmol/l értékre (11,00 este), majd csökkenés következett $7,66 \pm 1,22$ mmol/l értékre (11,00 délelőtt), utána további enyhe csökkenés $7,34 \pm 0,77$ mmol/l értékre a délutáni 2 órára a következő napon. A TP csoportban a Zuckerpatkányok normális átlagos vérglükóz értékeket adtak $5,25 \pm 0,16$ mmol/l értékkel délután 5,00 órakor, és az egyes értékek a 4,34-6,07 mmol/l tartományban helyezkedtek el. A glikémia növekedést mutatott körülbelül 3 mmol/l-től $8,34 \pm 0,47$ mmol/l értékig délután 11 óráig. Ezt követte egy állandó csökkenés az alapszinti értékekre, amelyet 8,00 időpontban délelőtt érték el ($5,64 \pm 0,23$), és amely megmaradt délelőtt 11,00 órakor ($5,33 \pm 0,14$ mmol/l) értéken, illetve $5,51 \pm 0,19$ mmol/l értéken a következő napon délután 2,00 órakor.

Az inzulinémia éjjeli-nappali profilja (lásd a 4B. ábrát)

A CO- és RP- Zucker patkányok erősen hiperinzulinémiásak voltak. Az inzulin értékei változékonyak voltak az 5,00 óra ebéd utáni időpont átlagértékeiben a CO-csoportban ($47,0 \pm 8,7$ ng/ml),

8,00 óránál délután ($45,5 \pm 7,7$ ng/ml), 5,00 óránál délelőtt ($54,2 \pm 5,7$ ng/ml) és 02 óránál a következő napon ($61,0 \pm 10,2$ ng/ml), NS), amely nem mutatott kapcsolatot a vérglükóz emelkedéseivel. Az RP-csoportban sötét fázisban 6,00 óra délutáni időtől 6,00 óra délelőtti időpontig szignifikáns módon növekedtek a plazmainzulin értékei, és délelőtt 5,00 órakor maximumot értek el. Ez a paraméter az erősen hiperinzulinémiás $50,0 \pm 8,2$ ng/ml értékről (0,500 délután), erősen hiperinzulinémiás $57,3 \pm 8,2$ ng/ml értékről (0,800 délután) $76,3 \pm 8,6$ ng/ml-re változott (0,500 délelőtt $p < 0,01$ a kezdeti értékkel szemben); és ezt követte egy csökkenés $58,3 \pm 7,3$ ng/ml-re (0,200 délután a következő napon). Ebben az RP csoportban az inzulin a vérglükóz kiugrásaiban erős fáziseltolódást mutatott. A TP csoportban a Zucker patkányok is hiperinzulinémiásak voltak. 5,00 óránál délután a plazmainzulin szignifikánsan alacsonyabb volt, mint RP-ban ($p < 0,05$ RP függően). A vérglükóz emelkedéseivel párhuzamosan (lásd a IV/3A. ábrát) nem volt emelkedés a plazmainzulinban délutáni 08,00 óránál. A legmagasabb inzulin értéket 5,00 óránál délelőtt mértük ($57,1 \pm 8,6$ ng/ml; $p < 0,01$ a kezdeti értékektől függően). A plazmainzulin koncentrációja csökkent az alapszintű koncentráció elérésével ($24,3 \pm 3,7$ ng/ml) körülbelül 2,00 óránál délután, a következő napon szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a CO vagy RP-csoportokban ($p < 0,01$ -nél CO vagy TP függésben).

Az OGTT 21 napos kezelés után; a vérglükóz görbéi (lásd az 5A. ábrát)

Az utolsó hatóanyagalkalmazást 05.00 délutáni értéknél és éjszakán át éheztetve a 21. napon követte egy szignifikáns csökkenés a glikémiában a CO csoportban a $8,68 \pm 1,26$ mmol/l

értékről (5,00 délután) $5,08 \pm 0,24$ mmol/l értékig ($p < 0,05$), az RP csoportban $8,81 \pm 1,21$ mmol/l értékről $4,91 \pm 0,37$ mmol/l értékre ($p < 0,01$); és a TP csoportban $5,75 \pm 0,23$ mmol/l értékről $4,88 \pm 0,13$ mmol/l-re ($p < 0,01$). Ennek következtében az orális glükózterheléseket egy összehasonlító alapszintű glükózkoncentrációs szintről alakítottuk ki mindhárom vizsgálati csoportban, és reggel 07.30 délelőtti értéknek jelöltük.

A CO-csoportban a glikémia orális glükóz alkalmazása után 40 percen belül $14,64 \pm 1,42$ mmol/l-re növekedett. Később enyhe szignifikáns csökkenés ment végbe $9,75 \pm 0,46$ mmol/l értékre a teszt végén (120 perc). Az RP csoportban meredek emelkedést figyeltünk meg a magasabb vérglükózértékek irányában ($16,33 \pm 0,98$ és $16,24 \pm 1,09$ mmol/l értékekre 50 percnél, illetve 80 percnél. A magas glükózkoncentrációk megmaradtak a vizsgálat végéig, azaz 120 percig (100 percnél: $15,13 \pm 0,76$ mmol/l, 120 percnél: $14,81 \pm 0,66$ mmol/l; NS az előző csúcserőtekekből). A TP-csoportban azt találtuk, hogy az átlagos vérglükóz-görbe hasonló sajátosságokkal rendelkezik, mint a CO-csoportban. A glikémia $14,54 \pm 0,65$ mmol/l értékre növekedett 50 percnél, és szignifikánsan csökkent $10,67 \pm 0,62$ mmol/l értékre (120 perc; NS CO-ból).

A CO- és TP-csoportokban a glükóz G-AUC_{0-120 perc} görbe alatti területe 823 ± 41 , illetve 895 ± 50 mmol.perc/liternek adódott. Az RP-csoportban ezt a paramétert 1096 ± 76 mmol.perc/l-nek határoztuk meg, és ez az érték szignifikánsan magasabb volt, mint a TP-csoportok a CO-ban ($p < 0,01$) vagy a TP-csoportokban ($p < 0,05$).

Az OGTT értéke 21 napos kezelés után; plazmainzulin (lásd az 5B. ábrát)

Éjszakán át tartó éheztetés a Zucker-patkányokon csökkent plazmainzulin koncentrációkat okozott a CO-állatokban ($14,6 \pm 3,7$ ng/ml), az RP-csoportban $11,8 \pm 1,5$ ng/ml-ig, és a TP-csoportban $9,3 \pm 1,5$ ng/ml-ig. A vizsgálati csoportok közötti különbségek nem voltak szignifikánsak. Glükózzal végzett stimulálás után a plazmainzulin legtöbbször változatlan maradt a CO-, RP- és TP-csoportokban. Némileg magasabb értékeket csak 120 percnél, csak a CO-csoportban találtunk, ennek értéke $21,3 \pm 3,0$ ng/ml-t tett ki, amely szignifikánsan magasabb, mint a TP-csoportban ($p < 0,05$).

Az $I-AUC_{0-120 \text{ perc}}$ általában csekély volt a TP-csoportban, ez a paraméter alacsonyabb értékű volt, mint a CO- vagy RP-csoportokban (NS).

Összefoglalás

A vérglükóz reggeli értékei

A placebóval kezelt kontrollok hiperglikémiások voltak (körülbelül $7,5$ mmol/l). Az átlagos koncentráció a vizsgálat alatt változatlan maradt; RP-terápia 2 napon belül körülbelül $1,5$ mmol/l értékkel növelte. A glikémia a magasabb tartományban maradt TP-kezelés 5 napon belül a vérglükózt normális értékre csökkentette. A vérglükóz a vizsgálatunk végéig a normális tartományban maradt.

Plazmainzulin

A kontrollként alkalmazott Zucker patkányok hiperinzulinémiások voltak és némi további inzulin-növekedést mutattak a 14 napos megfigyelés során. Az RP-vel kezelt Zucker

patkányok az inzulin növekedését mutatták szignifikánsan magasabb koncentrációig, mint a kontrollállatok. A TP alkalmazása enyhén csökkentette az inzulinkoncentrációt 14 napon át a kontrollállatokkal való összehasonlítás alapján.

OGTT 21 napos kezelés után; vérglükóz

Éjszakán át tartó éheztetés a vérglükóz szintjét a normális értékekre csökkentette a vizsgálati csoportokban. A placebóval kezelt állatok körülbelül 9 mmol/l vérglükóz-növekedést mutattak 40 percen belül a glükózterhelés után, és ezt követően csekély csökkenés volt megfigyelhető. Az RP-vel kezelt Zucker patkányok körülbelül 11 mmol/l vérglükóz-növekedést mutattak a glükózterhelés után, és ez a vizsgálat alatt nem csökkent. A TP-vel kezelt állatok átlagos vérglükóz-görbéje nem különbözött a kontrollállatokétól. Az RP-kezelés növelte a G-AUC értéket, a TP-gyógyszerelés nem növelte a G-AUC-értéket placebóval végzett összehasonlítás alapján.

OGTT 21 napos kezelés után; plazmainzulin

A kontrollként alkalmazott Zucker patkányoknak volt a legmagasabb inzulinszintje éheztetés után körülbelül 15 ng/ml értékkel a három vizsgálati csoportban. A glükózterhelés után az inzulin csak a vizsgálat végén (120 perc) növekedett szignifikánsan. Az RP-vel kezelt patkányoknak éheztetés utáni inzulintartalma némileg alacsonyabb volt körülbelül 12,5 ng/ml éheztetés utáni inzulinkoncentrációval az OGTT megkezdésekor, és egy korai növekedése 40 percnél, amely a teszt végéig nem csökkent. A TP-vel kezelt patkányok legalacsonyabb, éheztetés utáni inzulinértéke körülbelül 9 ng/ml-nek adódott az OGTT kezdetén, ezt követte egy korai mérsékelt növekedés 20 percnél a vérglükózzal kapcsolatban (vérglükózhoz viszonyítva) növekedő és

csökkent koncentrációkkal 40 perc és 100 perc között. TP-vel kezelt patkányokban az I-AUC érték valamivel alacsonyabbnak adódott.

Következtetés

A P32/98 (TP) DPIV gátló anyag naponta egyszer adagolva normalizálta a reggeli vérglükózt, csökkentette a hiperinzulinémiát, megtartotta a vérglükóz-tartalmat a nappali-éjjeli profilban a kritikus 8,3 mmol/l érték alatt (cukorbetegnek számára). A P32/98-val végzett gyógyszerelés után a metabolikus előny korlátozott időn át megmaradt.

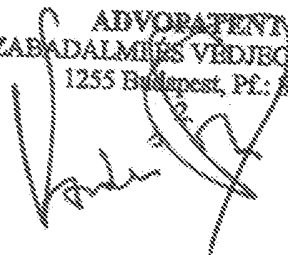
Szabadalmi igénypontok

1. Valamely DP IV enzim aktivitás inhibitor, a hasnyálmirigyben levő sejtek inzulintermelő sejtekké való differenciálódásának előidézésére történő felhasználásra, diabétesz mellitus megelőzésére emlősökben.
2. Az 1. igénypont szerinti DP IV enzim aktivitás inhibitor, II. típusú diabétesz mellitus megelőzésére emlősökben.
3. Az előző igénypontok bármelyike szerinti DP IV enzim aktivitás inhibitor **azzal jellemezve**, hogy a DP IV inhibitor valamely N-/N'-helyettesített glicil/-2-ciano-pirrolidin, N-aminoacil-tiazolidin vagy N-aminoacil-pirrolidin.
4. A 3.igénypont szerinti DP IV enzim aktivitás inhibitor **azzal jellemezve**, hogy a DP IV enzim aktivitás inhibitor L-treo-izoleucil-tiazolidin, L-allo-izoleucil-tiazolidin, L-treo-izoleucil-pirrolidin, L-allo-izoleucil-pirrolidin vagy gyógyászatilag alkalmas sóik.
5. Az előző igénypontok bármelyike szerinti DP IV enzim aktivitás inhibitor, orális adagolásra.
6. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti DP IV enzim aktivitás inhibitor, iv vagy im injekcióban történő felhasználásra.

7. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti DP IV enzim aktivitás inhibitor, krónikus orális adagolásra.
8. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti DP IV enzim aktivitás inhibitor krónikus iv vagy im adagolásra.
9. DP IV enzim aktivitás inhibitor felhasználása diabétesz mellitusnak az 1-8. igénypontok bármelyikében meghatározott megelőzésére alkalmas gyógyszer előállítására.

A meghatalmazott:

ADVOKÁTENT
SZABADALMI ÉS VÉDELMI IRODA
1255 Budapest, Pf.: 80.



47800

P0204459

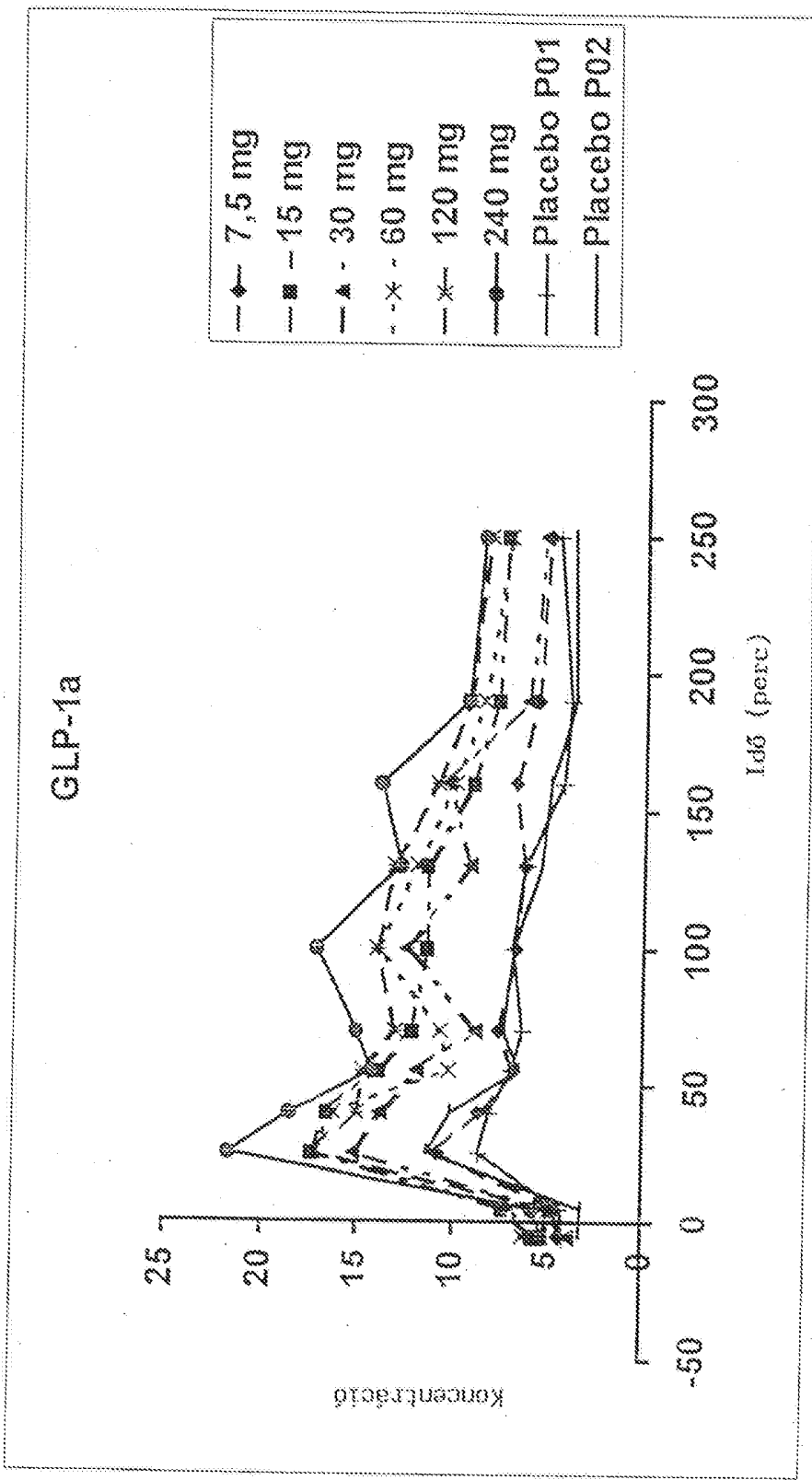
MEGADÁS ALAPJÁUL
SZÜZGÁLO VÁLIOZ...

7/1

NYOMDAPÉLDÁNY

Szabadalmi leírás

Figure 1

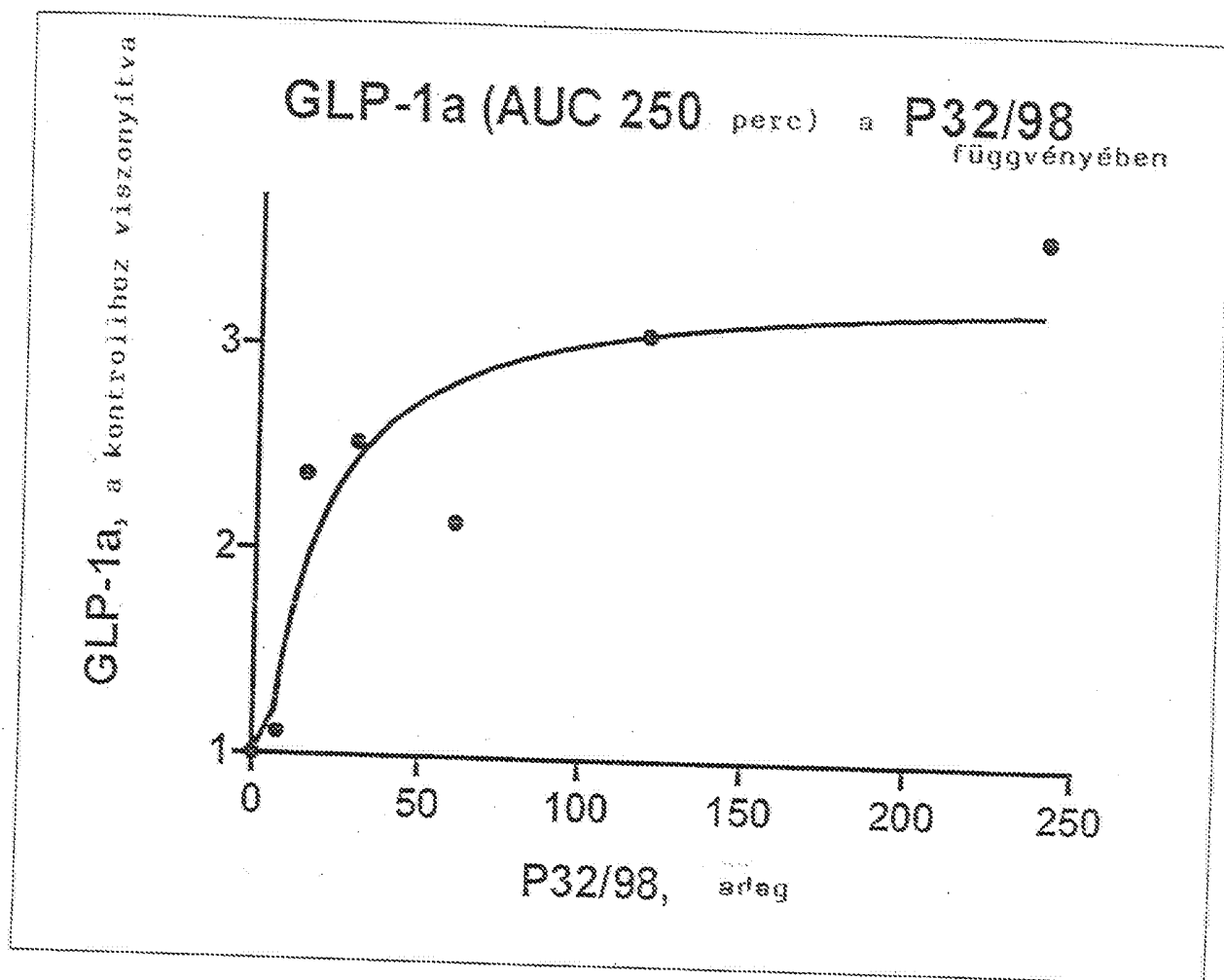


ADVOPATENT
SZABADALMI ÉS VÉDJEKY IRODA
KOVÁRI GYÖRGY
szabadalmi ügyvivő
1011 Budapest, Fő út 19.

[Handwritten signature]

Figure 2

NYOMDAPÉLDÁNY



NYOMDAPÉLDÁNY

Figure 3

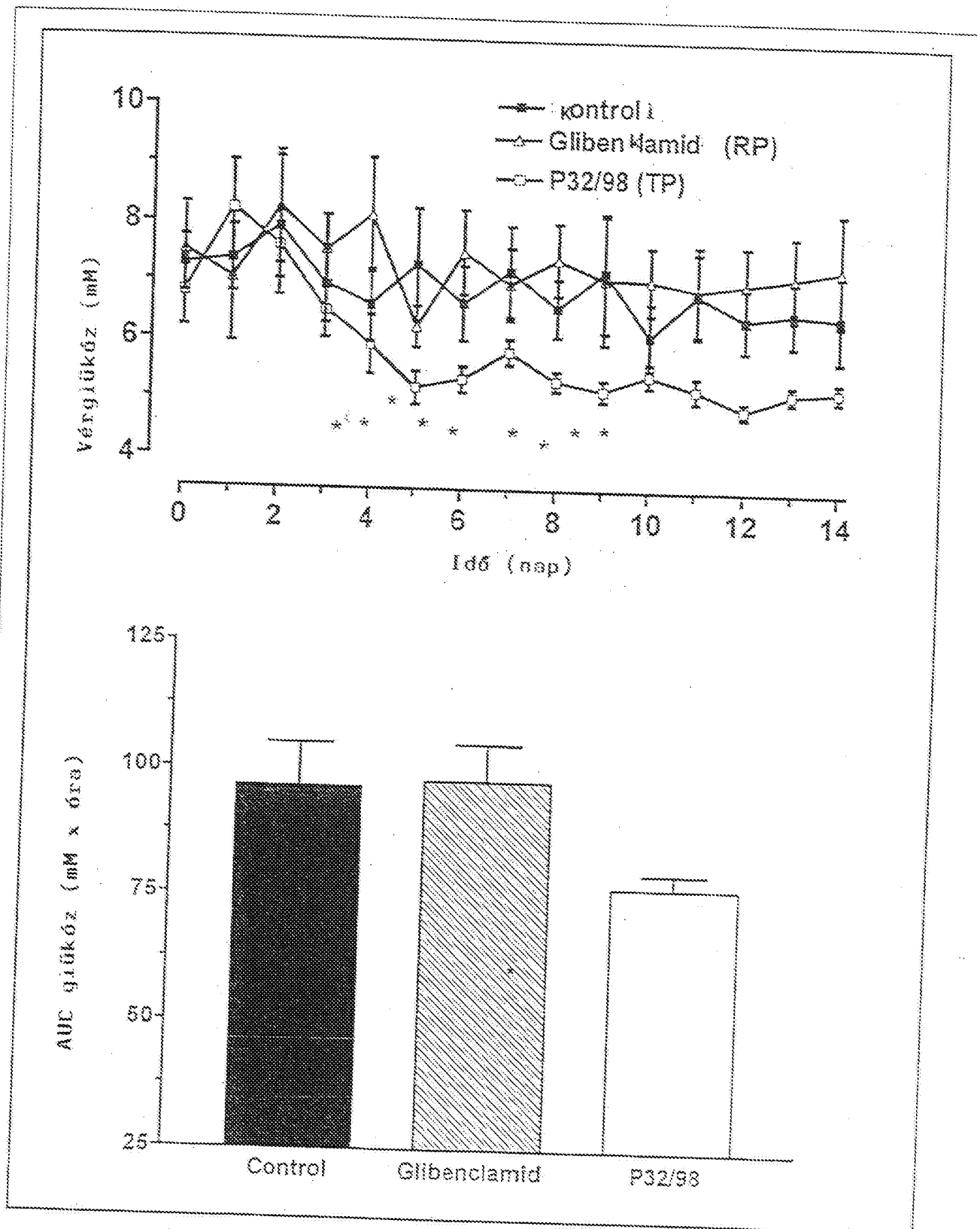


Figure 4A

NYOMDAPÉLDÁNY

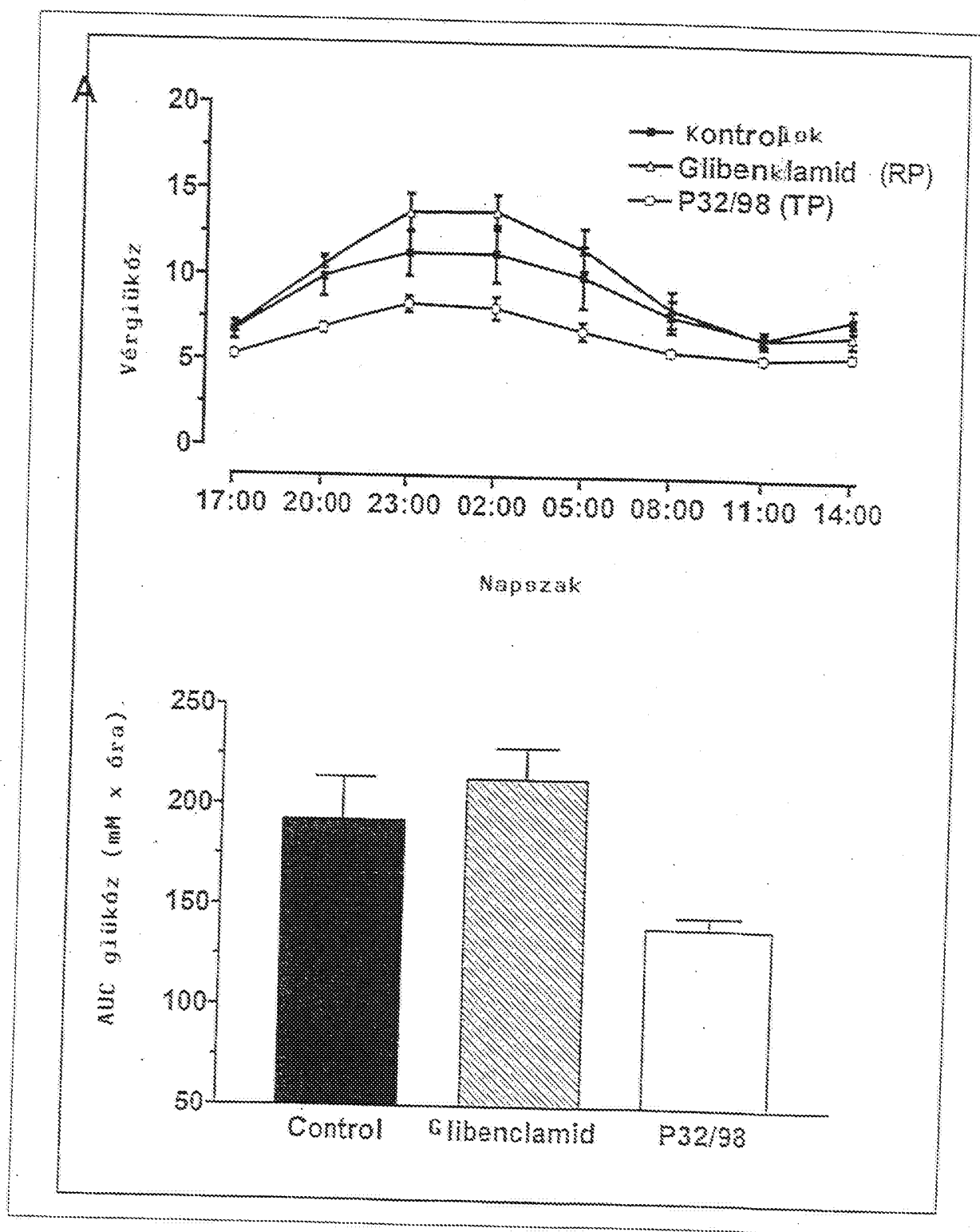


Figure 4 B

NYOMDAPÉLDÁNY

B

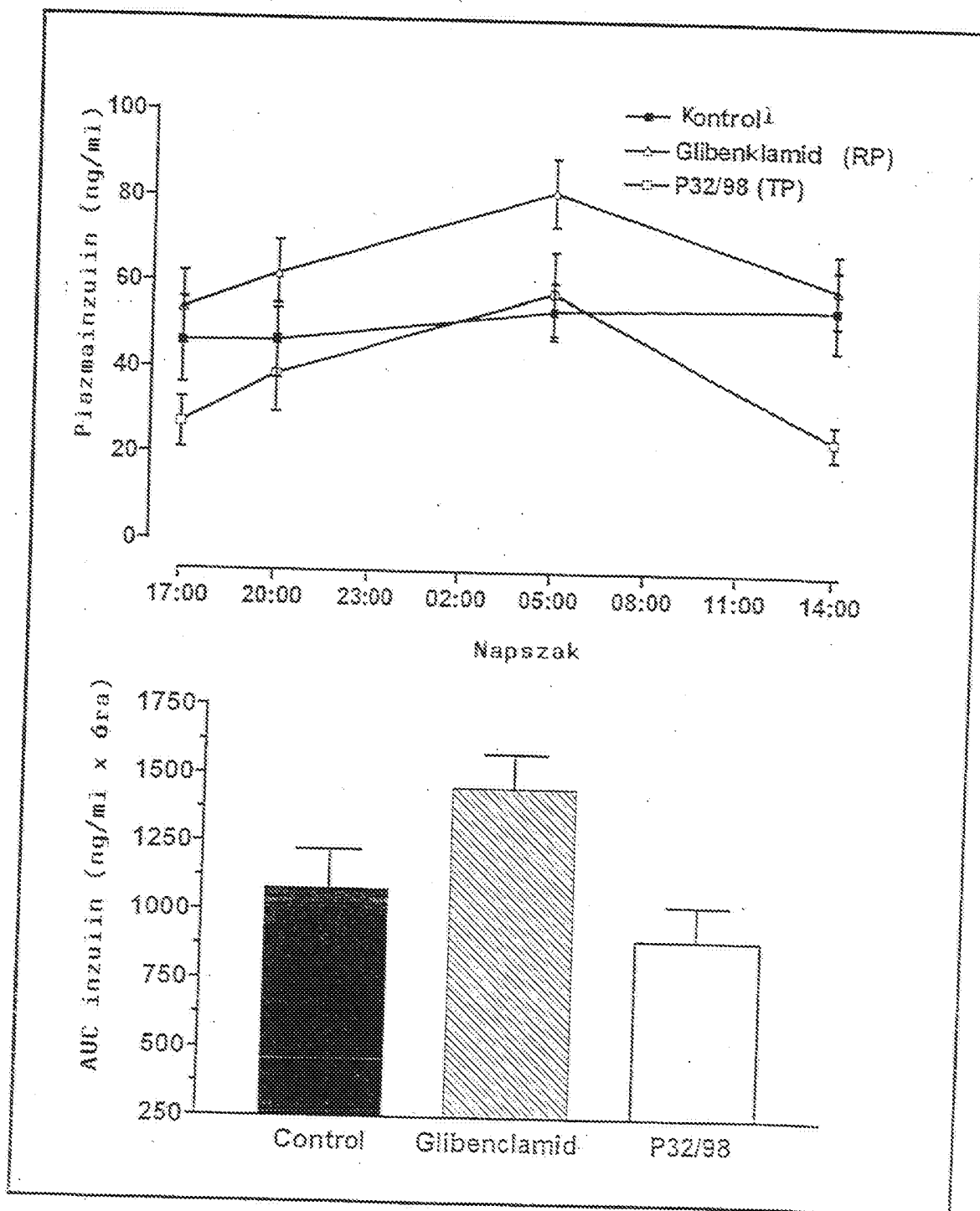


Figure 5 A

NYOMDAPÉLDÁNY

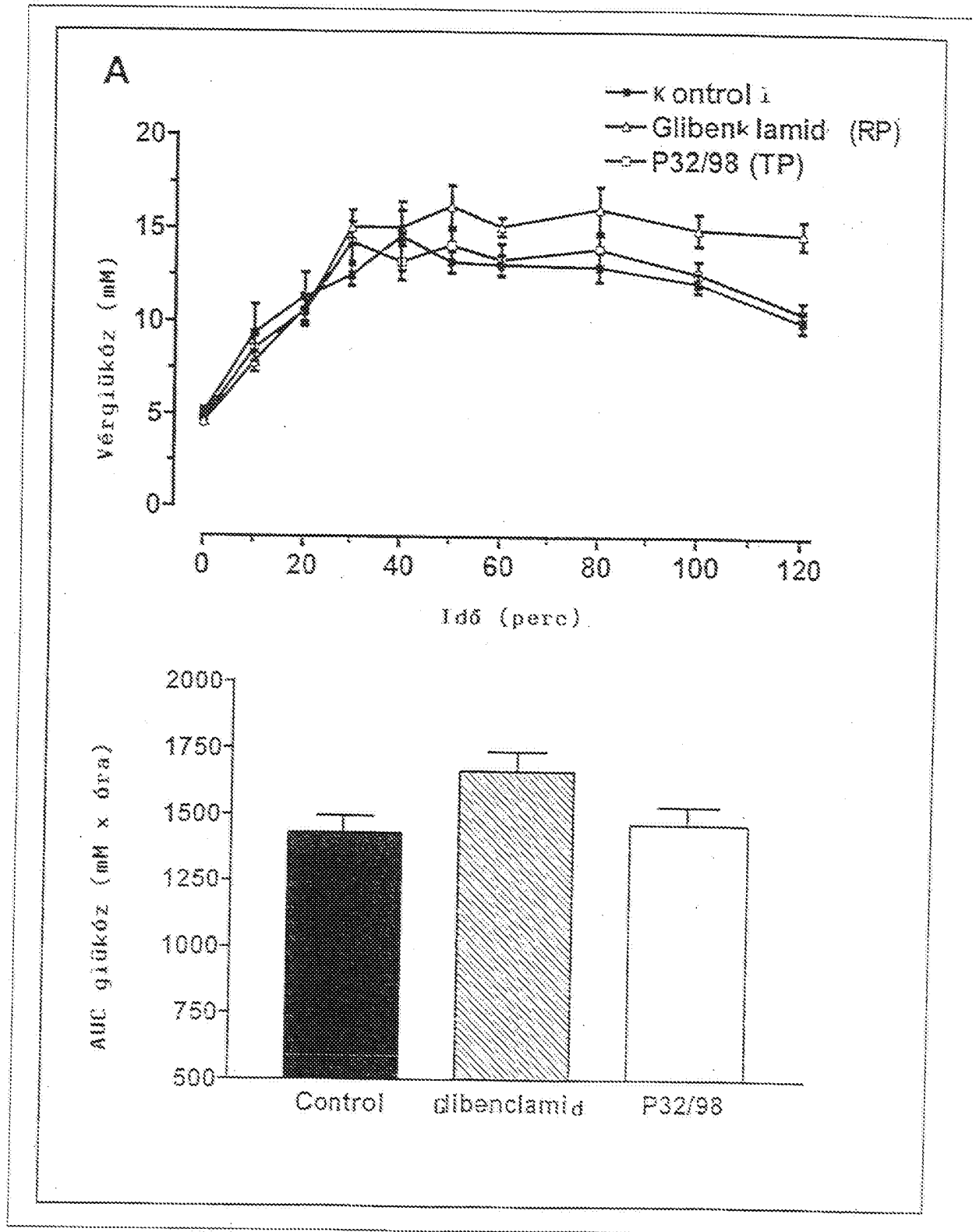


Figure 5 B

NYOMDAPÉLDÁNY

