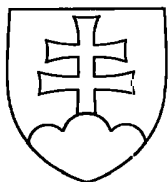


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ
PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania prihlášky: 7. 5. 1999
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 60/089 044
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 12. 6. 1998
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: US
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 6. 11. 2001
Vestník ÚPV SR č.: 11/2001
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT PCT/US99/10040
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT WO99/64061

(11), (21) Číslo dokumentu:

1904-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. 7

A61K 38/26

- (71) Prihlasovateľ: **BIONEBRASKA, INC., Lincoln, NE, US;**
(72) Pôvodca: **Goke Burkhard, Marburg, DE;**
Byrne Maria, Lincoln, NE, US;
(74) Zástupca: **ROTT, RŮZICKA & GUTTMANN, v. o. s., Bratislava, SK;**

(54) **Názov: Glukagónu podobný peptid-1 zlepšujúci odpoveď β-buniek na glukózu u subjektov so zhoršenou toleranciou glukózy**

(57) **Anotácia:**
Kompozícia na liečenie zhoršenej tolerancie glukózy (IGT) obsahujúca zlúčeninu, ktorá sa viaže na receptor na glukagónu podobný peptid-1 a farmaceutický nosič. Množstvo prítomnej zlúčeniny je efektívne množstvo na zlepšenie citlivosti pankreatických β-buniek na hladiny krvnej glukózy u ľudí s IGT. Metóda slúži tiež na zlepšenie modelu odpovedí vylučovaním inzulínu u ľudí s IGT podávaním kompozície, obsahujúcej zlúčeninu, ktorá sa viaže na receptor na glukagónu podobný peptid-1 a farmaceutický nosič.

Glukagónu podobný peptid-1 zlepšuje^{úci} odpoveď β -buniek na glukózu u subjektov so zhoršenou toleranciou glukózy

Oblasť techniky

Vynález sa týka prípravku obsahujúceho zlúčeninu viažucu sa na receptor „GLP-1“ a spôsobu liečby zhoršenej tolerancie glukózy.

Doterajší stav techniky

Zhoršená tolerancia glukózy (IGT-impaired glucose tolerance) je bežná v americkej populácii. Zatiaľ čo v bežnej populácii vo veku 20 až 74 rokov je zhoršená tolerancia glukózy u 11 % populácie, zvyšuje sa na 24 % v populácii vo veku 40 až 75 rokov s rodinným výskytom diabetes a telesnou hmotnosťou väčšou než 120 % normálu. U osôb so zhoršenou toleranciou glukózy existuje vysoké riziko vzniku kardiovaskulárnych ochorení a tiež vzniku diabetes mellitus nezávislej od inzulínu (NIDDM t.j. non-insulin dependent diabetes mellitus), známej tiež ako diabetes typu 2.

Zhoršená tolerancia glukózy je charakterizovaná prvotnými nepatrnými defektmi funkcie β -buniek čo je sprevádzané inzulínovou rezistenciou. Tieto prvotné defekty zahŕňujú zhoršenú schopnosť β -buniek vnímať malé zmeny koncentrácie glukózy v plazme a odpovedať na ne vylučovaním vhodných množstiev inzulínu a tiež mierny posun doprava u krivky vyjadrujúcej odpoveď sekréciou inzulínu v závislosti od dávky glukózy. Citlivosť na glukózu a schopnosť β -buniek rýchlo odpovedať sekréciou inzulínu sa stráca veľmi skoro v priebehu IGT, keď sú 2hodinové hladiny glukózy minimálne zvýšené. Zhoršenie kontroly glukózy pri IGT s časom je spôsobené najmä pokračovaním zhoršovania funkcie β -buniek. To vedie v mnohých prípadoch k zhoršovaniu stavov hyperinzulinémie, obezity a kardiovaskulárneho ochorenia označovaného niekedy ako syndróm X.

V mnohých prípadoch vedú pokročilé stavy IGT k definitívnej strate kontroly glukózy a k nástupu NIDDM.

Z uvedeného vyplýva, že stav IGT prináša závažné zdravotné riziká. Pacienti trpiaci IGT sú často obézni a majú vysoké hladiny inzulínu v plazme, ktoré sú často toxické. Tieto vysoké hladiny inzulínu spôsobuje všeobecne neustále sa zvyšujúca neschopnosť svalov, iných tkanív a tukových buniek využívať inzulín na to, aby bola spotrebovávaná glukóza z krvnej plazmy. Stav IGT zvyšuje riziká vzniku celého radu kardiovaskulárnych ochorení.

Glukagónu podobný peptid-1 (GLP-1 t.j. glucagon-like peptide-1), prirodzený črevný peptid, je vylučovaný črevnými L-bunkami a pôsobí ako hormón inkretin, ktorý stimuluje vylučovanie inzulínu pankreatickými β -bunkami v závislosti od glukózy. Terapeutický potenciál tohto peptidu pri NIDDM bol už skôr demonštrovaný tak, že exogénne infúzie farmakologických dávok GLP-1 všeobecne znižovali hladiny glukózy v plazme. Avšak GLP-1 nezlepšil významne funkciu β -buniek pri NIDDM. Nathan DM, Schreiber E, Fogel H, Mojsov S, Habener JF: Insulinotropic action of glucagon-like peptide-1 (7-37) in diabetic and nondiabetic subjects, *Diabetes Care* 15:270-276, 1992; Gutniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahrén B, Efendrik S: Antidiabetogenic effects of glucagon like peptide-1 (7-36) amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus, *N. Engl. J. Med.* 326:1316-1322, 1992; Nauck MA, Kleine N., Orskov C, Holst JJ, Wilms B, Creutzfeldt W.: Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous glukagon like peptide-1 (7-36 amide) in type II (non-insulin-dependent) diabetic patients, *Diabetologia* 36: 741-744, 1993; Gutniak MK, Linde B, Holst JJ, Efendie S: Subcutaneous injection of the incretin hormon glukagon-like peptide-1 abolishes postprandial glycemia NIDDM, *Diabetes Care* 17:1039-1044, 1994; Rachman J, Gribble FM, Barrow BA, Levy JC, Buchanan KD, Turner RC: Normalization of insulin responses to glucose by overnight infusion of glukagon-like peptide-1 (7-36) amide in patients with NIDDM, *Diabetes* 45:1524-1530, 1996; Rachman J, Barrow BA, Levy JC, Turner RC: Near-normalization of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM, *Diabetologia* 40: 205-211, 1997.

Stav IGT nie je v súčasnej dobe vyliečiteľný. Predsa však je rozpoznateľným ochorením, ktoré je spojené s vážnymi zdravotnými rizikami. Všeobecne sa stav IGT postupne zhoršuje z hľadiska jeho symptómov a často vedie k strate kontroly glukózy vyskytujúcej sa v plazme čo vytvára diabetes typu 2. Tu je potrebná terapia.

Rad štúdií v priebehu posledných niekoľkých rokov ukázal, že aplikácia GLP-1 v prípadoch NIDDM znižuje hladiny glukózy a inzulínu v krvi a tak by mala byť sľubnou terapiou pre túto chorobu. Avšak žiadne štúdie zatiaľ neukázali, že GLP-1 má potenciál napraviť stratu schopnosti β -buniek vnímať a rýchlo reagovať vylučovaním inzulínu, keď sa zvýši hladina krvnej glukózy. Je to práve toto zhoršenie schopnosti odpovedať a úzko spojiť vnímanie zvýšenia hladiny krvnej glukózy s vylučovaním inzulínu β -bunkami, ktoré je hlavnou príčinou stavu IGT. V predchádzajúcich štúdiách ukázala aplikácia GLP-1 na subjekty s NIDDM schopnosť normalizovať hladinu glukózy v plazme na lačno a stimulovať kumulatívne vylučovanie inzulínu β -bunkami. Avšak infúzie GLP-1 uskutočňované cez noc nezlepšili glukózové odpovede na jedlá podávané v nasledujúcom dni. Keď bola infúzia GLP-1 uskutočňovaná u osôb s NIDDM počas 19 hodín, cez noc a v priebehu troch bežných jedál, zredukovala sa hladina glukózy v plazme, ale zhoršená postprandiálna funkcia β -buniek sa zlepšila iba nepatrne.

Odpovede β -buniek na predĺženú infúziu GLP-1 neboli skôr študované u subjektov s IGT a pretože neboli žiadne náznaky, že by výsledky mohli byť odlišné ako u infúzií GLP-1 v prípade NIDDM, neboli doposiaľ uskutočňované podrobné štúdie vplyvu GLP-1 na odpovede β -buniek na malé zvyšovanie a znižovanie koncentrácií glukózy v plazme.

Z uvedeného vyplýva potreba metódy, ktorá by zastavila postup IGT a obnovila normálny stav metabolizmu glukózy.

Preto je cieľom predkladaného vynálezu zaistiť metódu umožňujúcu obnoviť alebo zlepšiť funkciu β -buniek a ich citlivosť a tým vylučovanie inzulínu v odpovedi na hladiny glukózy v plazme u osôb majúcich zhoršenú toleranciu glukózy.

Ďalším cieľom vynálezu je zaistiť spôsob, ktorý oneskorí alebo zabráni zhoršovaniu funkcie β -buniek, ktorá je zodpovedná za progresiu zhoršenej tolerance glukózy až k strate regulácie glukózy v plazme čo charakterizuje nástup NIDDM.

Ďalším cieľom vynálezu je zmierniť vplyvy IGT vedúce ku kardiovaskulárnym ochoreniam, a tak znížiť riziká týchto ochorení a mŕtvice.

Spôsob splňujúci tieto a ďalšie ciele bude zrejmý z nasledujúceho detailného opisu.

Podstata vynálezu

Vynálezcovia objavili, že aplikácia GLP-1 subjektom so zníženou toleranciou glukózy obnoví úzko koordinovanú odpoveď vylučovania inzulínu na zvýšenie hladín glukózy v plazme a tak znovu nastaví priebeh inzulínovej odpovede β -buniek na vzrast hladiny glukózy v plazme, ktorý je charakteristický pre normálne subjekty, ktoré netrpia IGT.

Predkladaný vynález je zameraný na spôsob liečby osôb trpiacich zhoršenou toleranciou glukózy a inzulínovou rezistenciou s použitím GLP-1 v množstve účinnom na obnovenie, zlepšenie alebo normalizáciu citlivosti a funkcie β -buniek a vylučovanie inzulínu. Vynález je tiež zameraný na spôsob znižovania hladiny inzulínu v plazme u osôb s IGT a súbežne redukciu stavu inzulínovej rezistencie a sprievodných kardiovaskulárných ochorení.

Pri uskutočňovaní tu opísaných príkladov vynálezcovia prekvapivo pozorovali, že aplikácia GLP-1 u subjektov s IGT, v kontraste k náhodnej a nekoordinovanej inzulínovej odpovedi charakteristicky sa vyskytujúcej u subjektov s IGT, dramaticky obnovuje citlivé, rýchle a koordinované vylučovanie inzulínu β -bunkami v odpovedi na jednotlivé pulzačné zvyšovanie koncentrácie glukózy v plazme, podobnej modelu vylučovania inzulínu u normálnych pacientov.

Vynálezcovia objavili, že podávanie GLP-1 subjektom so zhoršenou toleranciou glukózy (IGT) obnovuje alebo zlepšuje funkciu pankreatických β -buniek a schopnosť β -buniek rýchlo odpovedať vylučovaním inzulínu koordinovaným spôsobom v odpovedi na malé zvýšenie alebo zmeny koncentrácie glukózy v plazme, t.j. pulzačným vylučovaním inzulínu podobným spôsobom, ako prebieha vylučovanie inzulínu u subjektov bez IGT. Tento spôsob vylučovania inzulínu nie je obnovený u subjektov, u ktorých je už rozvinutý stav NIDDM, ktorý je charakterizovaný stratou regulácie glukózy v plazme.

Funkcia β -buniek je kvantifikovaná normalizovanou spektrálnou silou. Spektrálna sila meria funkciu β -buniek, ktorá nezávisí od nastavenia citlivosti pre inzulín. Vynálezcovia zistili, že u subjektov s IGT zlepšuje GLP-1 spektrálnu silu na normálny rozsah. Profily spektrálnych síl indikujú, že úzka koordinácia glukózy v plazme a oscilácií vylučovania inzulínu bola u subjektov s IGT po podávaní GLP-1 obnovená na normálnu úroveň. Toto zlepšenie oscilačného modelu vylučovania inzulínu je dôležité na udržanie normálnej homeostázy glukózy. Napríklad bolo ukázané, že inzulínové infúzie, ktoré napodobňujú ultradiálne oscilácie s periódou 120 minút, sú efektívnejšie pre redukciu koncentrácií glukózy v plazme, než konštantné infúzie inzulínu (27).

Predkladaný vynález poskytuje kompozíciu zahrnujúcu zlúčeninu, ktorá sa viaže na receptor pre glukagónu podobný peptid-1 a je účinná na zlepšenie schopnosti β -buniek vnímať a odpovedať na malé zmeny v koncentráciách glukózy v plazme u subjektov s IGT. V jednom uskutočnení zlúčeninou viažucou sa na receptor je glukagónu podobný peptid-1. V inom uskutočnení zlúčeninou viažucou sa na receptor je variantný peptid, v ktorom sa kombinácia substitúcií, delécií a variantov nelíši o viac ako 10 aminokyselín od glukagónu podobného peptidu-1. Zlúčenina viažuca sa na receptor môže ďalej zahrnovať polynukleotid alebo látku, ktorá aktivuje uvoľňovanie GLP-1, molekulu, ktorá aktivuje receptor pre GLP-1, alebo zlúčeninu viažucu sa na receptor pre GLP-1, zahrnujúcu chemicky konštruovanú molekulu, analógy peptidov alebo agonistov GLP-1.

Vynálezcovia objavili, že podávanie ľudského GLP-1 zlepšuje alebo obnovuje odpoveď vylučovaním inzulínu na malé zmeny alebo zvýšenie glukózy v

plazme. V súlade s tým je kompozícia podľa predkladaného vynálezu užitočná pre terapiu vedúcu k normalizácii zhoršenej tolerancii glukózy.

Vynálezcovia tu demonštrovali, že infúzia nízkych dávok GLP-1 môže zlepšiť funkciu β -buniek, aby vylučovali inzulín v odpovedi na zvýšené hladiny glukózy v plazme. GLP-1 môže byť tiež použitý na zlepšenie zachovania funkcie β -buniek u subjektov s IGT. Podávanie GLP-1 tiež reguluje alebo normalizuje modely vylučovania inzulínu, čo spôsobí celkové zníženie inzulínu v plazme pri IGT. Táto normalizácia znížením spôsobí obmedzenie stavu rezistencie k inzulínu (inzulínovej rezistencie).

Termín "GLP-1" označuje glukagónu podobný peptid a zahrnuje mimetiká GLP-1 a tak, ako je používaný v kontexte predkladaného vynálezu, môže zahŕňať glukagónu podobné peptidy a príbuzné peptidy a analógy glukagónu podobného peptidu-1, ktoré sa viažu k receptorovému proteínu pre glukagón podobný peptid-1 (GLP-1), také ako je GLP-1 (7-36) amid receptorový proteín, a majú zodpovedajúci biologický efekt na sekréciu inzulínu, ako GLP-1 (7-36) amid, ktorý je natívnou, biologicky aktívnou formou GLP-1. Viď Göke, B and Byrne, M, *Diabetic Medicine*, 1996, 13:854-860. Receptory pre GLP-1 sú bielkoviny na povrchu buniek nachádzajúce sa napríklad na pankreatických β -bunkách produkujúcich inzulín. Glukagónu podobné peptidy a analógy budú zahŕňať druhy majúce inzulínotropnú aktivitu a ktoré sú agonistami, t.j. aktivujú receptorovú molekulu pre GLP-1 a jej druhú mediátorovú (messenger) aktivitu okrem iného na β -bunky produkujúce inzulín. Agonisti, ktorí vykazujú aktivitu cez tento receptor boli opísaní v: EP 0708179A2; Hjorth, S.A. et al., *J. Biol. Chem.* 269 (48):30121-30124 (1999); Siegel, E.G. et al. Amer. Diabetes Assoc. 57th Scientific Sessions, Boston (1997); Adelhorst, K. et al. *J. Biol. Chem.* 269(9):6275-6278 (1994); Deacon, C.F. et al. 16th International Diabetes Congress Abstracts, *Diabetologia Supplement* (1997); Irvin, D.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:7915-7920 (1997); Mosjov, S. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 40:333-343 (1992). Glukagónu podobné molekuly zahrnujú polynukleotidy, ktorých expresiou vznikajú agonisti GLP-1, t.j. aktivátory receptorovej molekuly pre GLP-1 a jej sekundárne mediátorové aktivity nachádzajúce sa okrem iného

na β -bunkách produkujúcich inzulín. Látky napodobňujúce (mimetiká) GLP-1, ktoré sú tiež agonistami β -buniek, zahŕňajú napríklad chemické zlúčeniny špecificky navrhnuté na aktiváciu receptora pre GLP-1. Antagonisti glukagónu podobného peptidu-1 sú tiež známi, viď napríklad Watanabe, Y. et al., *J. Endocrinol.* 140(1) 45-52 (1994), a zahŕňajú exendin (9-39) amín, analóg exendinu, ktorý je účinným antagonistom receptorov pre GLP-1 (viď napr. WO97/46584). Nedávne publikácie opisujú GLP-1 z čiernej vdovy (Black Widow GLP-1) a Ser² GLP-1, viď Holz, J.F. Hakner/*Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 121(1998)177-184 a Ritzel et al., *A synthetic glucagon-like peptide-1 analog with improved plasma stability*, *J. Endocrinol* 1998 Oct.; 159(1): 93-102.

Nasledujúce uskutočnenia zahŕňajú chemicky syntetizované glukagónu podobné polypeptidy a taktiež akékoľvek polypeptidy alebo ich fragmenty, ktoré sú podstatne homológne. "Podstatne homológne", čo sa môže vzťahovať na nukleové kyseliny i sekvencie aminokyselín, znamená, že sekvencia určitého subjektu, napríklad sekvencia mutantu, sa líši od referenčnej sekvencie jednou alebo viacerými substitúciami, deléciami (vynechaniami) alebo adíciami (pridaniami) a tieto odlišnosti nespôsobia nepriaznivú zmenu funkcie danej sekvencie vzhľadom k sekvencii referenčnej. Na účely tohto vynálezu sú za podstatne homológne považované sekvencie majúce väčšiu ako 50% homológiu a prednostne väčšiu ako 90% homológiu, ekvivalentnú biologickú aktivitu v β -bunkách so zlepšenými odozvami na hladiny glukózy v plazme a ekvivalentné expresné charakteristiky. Na účely určovania homológie by malo byť ignorované skrátenie prirodzenej sekvencie. Sekvencie, ktoré majú menšie stupne homológie, porovnateľnú bioaktivitu a ekvivalentné expresné charakteristiky sú považované za ekvivalenty.

Cicavčie GLP peptidy a glukagón sú kódované rovnakým génom. V ileu je fenotyp spracovávaný na dve hlavné triedy GLP peptidových hormónov, menovite GLP-1 a GLP-2. Sú známe štyri proteíny príbuzné GLP-1, ktoré sú tvorené z fenotypových peptidov. GLP-1 (1-37) má sekvenciu His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly (SEQ. ID NO:1). GLP-1 (1-37) je amidovaný v posttranslačnom procese a vzniká GLP-1 (1-36) NH₂, kto-

rý má sekvenciu His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg (NH₂) (SEQ.ID NO:2); alebo je menený enzymaticky a tvorí sa GLP-1 (7-37), ktorý má sekvenciu His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly (SEQ.ID NO:3). GLP-1 (7-37) môže byť tiež amidovaný a vzniká GLP-1 (7-36) amid, ktorý je prirodzene sa vyskytujúcou formou molekuly GLP-1 a ktorý má sekvenciu His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg (NH₂) (SEQ.ID NO:4) a v prirodzenej forme je molekulou GLP-1.

Črevné L-bunky vylučujú GLP-1 (7-37) (SEQ. ID NO:3) a GLP-1 (7-36) NH₂ (SEQ.ID NO:4) v pomere 1 ku 5 v uvedenom poradí. Tieto skrátené formy GLP-1 majú krátky polčas životnosti *in situ*, t.j. menej ako 10 minút a sú inaktivované aminodipeptidázou IV za vzniku Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly (SEQ. ID NO: 5), resp. Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg (NH₂) (SEQ. ID NO: 6). Usudzuje sa, že peptidy Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly (SEQ. ID NO: 5) a Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg (NH₂) (SEQ. ID NO: 6) ovplyvňujú produkciu pečenej glukózy, ale nestimulujú produkciu alebo uvoľňovanie inzulínu zo slinivky brušnej (pankreasu).

V jedoch z jašterice (*Gila monster*) sa nachádza 6 peptidov, ktoré sú homologné s GLP-1. Ich sekvencie sú v tabuľke 1 porovnané so sekvenciou GLP-1.

Tabuľka 1

- a. HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRNH₂
- b. HSDGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGA
PPPSNH₂
- c. DLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
NH₂
- d. HEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGA
PPPSNH₂
- e. HSDATFTA EY SKLLAKLALQKYLE SILGSSTSPRPP
SS
- f. HSDATFTA EY SKLLAKLALQKYLE SILGSSTSPRPP
S
- g. HSDAIFTEEY SKLLAKLALQKYLASILGSRTSPPP
NH₂
- h. HSDAIFTQQY SKLLAKLALQKYLASILGSRTSPPP
NH₂
- a=GLP-1(SEQ. ID NO:4)
b=Exendin 3(SEQ. ID NO:7)
c=Exendin 4(9-39)NH₂(SEQ. ID NO:8)
d=Exendin 4(SEQ. ID NO:9)
e=Helospectin I(SEQ. ID NO:10)
f=Helospectin II(SEQ. ID NO:11)
g=Helodermin(SEQ. ID NO:12)
h=Q⁸, Q⁹ Helodermin(SEQ. ID NO:13)

Hlavné homológie, ktoré ukazuje tabuľka 1 sú: peptid c, resp. h je odvodený od peptidu b, resp. g. Všetkých 6 prirodzene sa vyskytujúcich peptidov (a, b, d, e, f, g) je homológnych v pozícií 1, 7, 11 a 18. GLP-1 a exendiny 3 a 4 (a, b, d) sú ďalej homológne v pozíciách 4, 5, 6, 8, 9, 15, 22, 23, 25, 26 a 29. V pozícií 2 sú A, S a G štruktúrne podobné. V pozícií 3 sú zvyšky D a E (Asp a Glu) štruktúrne podobné. V pozíciách 22 a 23 sú F (Phe) a I (Ile) štruktúrne podobné s Y (Tyr), resp. L (Leu), v uvedenom poradí. Podobne v pozícií 26 L a I sú štruktúrne ekvivalentné.

Tak z 30 zvyškov GLP-1 sú exendiny 3 a 4 identické v 15 pozíciách a ekvivalentné v 5 ďalších pozíciách. Jediné pozície, kde sú evidentné radikálne štruktúrne zmeny, sú na zvyškoch 16, 17, 19, 21, 24, 27, 28 a 30. Exendiny majú tiež 9 ďalších zvyškov na karboxylovom konci.

Peptidy podobné GLP-1 môžu byť vyrobené chemickou syntézou peptidov na pevnej fáze. GLP-1 môže byť tiež vyrobený konvenčnými rekombinantnými technikami, ktoré používajú štandardné metódy, ktoré opísali napríklad Sambrook a Maniatis. "Rekombinantný", tak ako je tu používané, znamená, že proteín pochádza z rekombinantných (napríklad mikrobiálnych alebo cicavčích) expresných systémov, ktoré boli geneticky modifikované, aby obsahovali expresný gén pre GLP-1 alebo jeho biologicky aktívne analógy.

Peptidy podobné GLP-1 môžu byť izolované a purifikované z kultúr rekombinantných buniek metódami, ktoré zahrnujú, ale nie sú obmedzené na: zrážanie síranom amónnym alebo etanolom, kyslú extrakciu, chromatografiu na meničoch aniónov alebo kationov, chromatografiu na fosfocelulóze, chromatografiu s hydrofóbnou interakciou, afinitnú chromatografiu, hydroxylapatitovú chromatografiu a lektínovú chromatografiu. Pre finálne purifikačné kroky môže byť využitá vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC).

Polypeptidy predkladaného vynálezu môžu byť prírodné purifikované produkty, alebo produkty postupov chemickej syntézy, alebo môžu byť produkované rekombinantnými technikami z prokaryotických alebo eukaryotických hostiteľských buniek (ako sú napríklad bunky baktérií, kvasiniek, vyšších rastlín, hmyzie

a cicavčie bunky v kultúre alebo *in vivo*). V závislosti od hostiteľských buniek používaných pri postupe využívajúcom rekombinantnú produkciu, polypeptidy predkladaného vynálezu nie sú obvykle glykozylované, ale môžu byť glykozylované.

Aktivita GLP-1 môže byť určovaná štandardnými metódami, všeobecne postupmi vyšetrujúcimi väzbovú aktivitu vzhľadom k receptoru, čo zahŕňa zaistenie vhodných buniek, ktoré exprimujú receptor pre GLP-1 na svojom povrchu, napríklad bunkové línie inzulínové ako bunky RINmSF alebo bunky INS-1. Viď tiež Mojsov, S. (1992) a EP0708170A2. Okrem merania špecifickej väzby molekuly s rádioaktívnou značkou na membránu s použitím metód rádioimunoanalýzy, môže byť tiež meraná aktivita cAMP alebo produkcia inzulínu závislá od glukózy. V jednej metóde je polynukleotid kódujúci receptor predkladaného vynálezu použitý na transfekciu buniek, aby produkovali receptorový proteín pre GLP-1. Tak napríklad môžu byť tieto metódy použité na vyhľadávanie agonistu k receptoru (látka viažuca sa špecificky na daný receptor) kontaktovaním takých buniek látkami, z ktorých sa vyhľadáva a určením, či také látky generujú signál, t.j. aktivujú receptor.

Na použitie v tu opísaných metódach môžu byť použité na detekciu čistoty a identifikáciu peptidov podobných GLP-1 polyklonálne a monoklonálne protilátky. Protilátky také ako ABGA1178 detegujú intaktný neštiepený GLP-1 (1-37) alebo na N konci skrátenej GLP-1 (7-37) alebo (7-36) amid. Iné protilátky sú schopné detekcie na úplnom C-konci molekuly prekursora postupom, ktorý umožňuje odčítaním vypočítať množstvo biologicky aktívneho skrátenej peptidu, t.j. GLP-1 (7-37) alebo (7-36) amidu (Orskov et al. *Diabetes*, 1993, 42:658-661; Orskov et al. *J. Clin. Invest.* 1991, 87:415-423).

Ďalšie vyhľadávacie techniky zahŕňajú použitie buniek, ktoré exprimujú receptor pre GLP-1, napríklad CHO bunky po transfekcii, v systéme, ktorý meria extracelulárne pH (mimo bunky) alebo iónové zmeny spôsobené aktiváciou receptora. Potenciálny agonista môže byť napríklad kontaktovaný s bunkami, ktoré exprimujú receptorový proteín pre GLP-1 a môže byť meraná druhotná odozva,

ako napríklad transdukcia signálu alebo zmeny iónovej sily alebo zmeny pH, aby sa určilo, či je potenciálny agonista efektívny.

Proteíny, ktoré sa viažu na receptor pre glukagónu podobný peptid-1 používané v predkladanom vynáleze môžu byť použité v kombinácii s vhodným farmaceutickým nosičom. Taká kompozícia zahrnuje terapeuticky efektívne množstvo polypeptidu a farmaceuticky prijateľný nosič alebo excipient. Také nosiče zahŕňujú, ale nie sú obmedzené na salinický roztok, pufrovaný salinický roztok, dextrózu, vodu, glycerol, etanol, laktózu, fosfát, manitol, arginín, trehalózu a ich kombinácie. Formulácie by mali byť vhodné na podávanie a sú rýchlo zistiteľné tými, ktorí majú potrebné znalosti v tomto odbore. Peptid GLP-1 môže byť tiež používaný v kombinácii s činidlami, o ktorých je známe, že zvyšujú polčas životnosti peptidu *in vivo*, aby sa zvýšila alebo predĺžila biologická aktivita peptidu. Napríklad môže byť na kompozícii podľa vynálezu pred vlastným podávaním kovalentne viazaná molekula alebo chemická skupina. Alternatívou je podávanie činidla zvyšujúceho polčas životnosti súbežne s kompozíciou. Ďalšou možnosťou je, že činidlo ktoré môže obsahovať molekulu o ktorej je známe, že inhibuje enzýmovú degradáciu peptidov ako GLP-1, môže byť podávané súbežne alebo až po podávaní kompozície obsahujúcej peptid GLP-1. Taká molekula môže byť podaná napríklad ústami alebo injekčne.

GLP-1 môže byť podávaný intravenózne alebo injekčne a môže byť podávaný kontinuálne alebo jednorázovou injekciou. Totálne podávanie môže byť súčasne s infúziou alebo injekciou glukózy i po nej a pred ňou. Môžu byť použité nasledujúce dávky: pre kontinuálnu infúziu (I.V.) 0,1 pmol/kg/min až 10 pmol/kg/min a pre podkožnú (S.C.) 0,1 pmol/kg/min až 75 pmol/kg/min a pre jednorázovú vnútrožilovú injekciu (I.V.) 0,005 nmol/kg až 20 nmol/kg a pre jednorázovú podkožnú injekciu (S.C.) 0,1 nmol/kg až 100 nmol/kg.

Kontinuálna aplikácia peptidu GLP-1 je uprednostňovanou metódou podávania. Predsa však GLP-1 môže byť podané podkožne, vnútro svalovo, interperitoneálne, injekčnou dávkou s postupným uvoľňovaním, hlbokým vdýchnutím do pľúc s predĺženým uvoľňovaním a tiež vnútrožilovou a ústnou cestou alebo inými metódami.

Účinné liečenie IGT tiež znižuje riziko kardiovaskulárnych a mozgových cievnych príhod a môže byť teda prevenciou zaisťovanou pacientom kde je známe vysoké riziko takých príhod.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 znázorňuje glukózu, inzulín a GLP-1 v odozve na podanie 75 mg glukózy ústami u piatich subjektov so zhoršenou toleranciou glukózy (IGT •) a u piatich subjektov s diabetes mellitus nezávislou od inzulínu (NIDDM). Obrázok 1A ukazuje významnú glukózovú odozvu. Obrázok 1B ukazuje inzulínovú odpoveď. Obrázok 1C ukazuje odozvu GLP-1.

Obrázok 2 ukazuje porovnanie významných vylučovacích rýchlostí inzulínu (ISR) a významných koncentrácií glukózy v každom subjekte v priebehu infúzie glukózy s infúziou salinického roztoku (O) alebo infúziou GLP-1 (•). Obrázok 2A ukazuje porovnanie subjektov s IGT. Obrázok 2B ukazuje porovnanie subjektov s NIDDM.

Obrázok 3 ukazuje profil sekrécie glukózy, rýchlosti sekrécie inzulínu (ISR) a koncentrácie inzulínu u dvoch subjektov s IGT, subjektov D01 a D02. Obrázky 3A a 3C ukazujú odpovede na infúziu salinického roztoku. Obrázky 3B a 3D znázorňujú odpovede na infúziu s GLP-1.

Obrázok 4 znázorňuje porovnanie hladín glukózy, rýchlosti vylučovania inzulínu (ISR) a hladín inzulínu u dvoch subjektov s NIDDM, subjektov D07 a D09. Obrázky 4A a 4C ukazujú profily v priebehu infúzie salinického roztoku. Obrázky 4B a 4D znázorňujú profily v priebehu infúzie obsahujúcej GLP-1.

Obrázok 5 znázorňuje porovnanie spektrálnych analýz vylučovania inzulínu u subjektov v priebehu infúzií salinického roztoku a GLP-1. Výsledky znázornené na ľavej strane spektrálnej analýzy sú subjekty s IGT. Výsledky ukázané na pravej strane spektrálnej analýzy sú subjekty s NIDDM.

Obrázok 6 poskytuje porovnanie normalizovanej sily spektier v priebehu infúzie salinického roztoku a v priebehu infúzie GLP. Obrázok 6A ukazuje porovnanie normalizované spektrálnej sily v priebehu infúzie salinického roztoku a v priebehu infúzie GLP-1 u subjektov s IGT (D02). Obrázok 6B ukazuje porovnanie normalizovanej spektrálnej sily v priebehu infúzie salinického roztoku a infúzie obsahujúcej GLP-1 u subjektov s NIDDM (D07).

Príklady uskutočnenia vynálezu

Nasledujúce príklady ďalej ilustrujú aspekty predloženého vynálezu. Tieto príklady však nemajú byť v žiadnom prípade braté ako obmedzenie myšlienok alebo zistení predkladaného vynálezu na obmedzenia dané príkladmi, pokiaľ ide o rozsah.

Štúdie tu opísané boli uskutočňované na 10 subjektoch, ktoré boli rozdelené do dvoch skupín na základe odozvy ich plazmatickej glukózy na test tolerance glukózy podanej ústami (oral glucose tolerance test) pri použití kritérií Svetovej zdravotníckej organizácie (21) pre definovanie stupňa intolerancie glukózy. Päť subjektov malo IGT a päť NIDDM. Pohlavie, vek, index telesnej hmotnosti (BMI), základné (bazálne) hladiny glukózy na lačno, dvojhodinová glukóza, inzulín na lačno a HBA1c pre každý subjekt sú uvedené v tabuľke 2. Subjekty s diabetes boli staršie ako subjekty s IGT, ale skupiny boli vyrovnané čo sa týka BMI. Priemerné hladiny glukózy na lačno a koncentrácie glykozylovaného hemoglobínu boli v skupine s IGT nižšie v porovnaní so skupinou s NIDDM. Hladiny inzulínu na lačno sa medzi oboma skupinami nelíšili.

Tabuľka 2

Základné klinické parametre subjektov s IGT a NIDDM

id. ozn.	pohlavie	vek	BMI	glukóza na lačno (mM)	2 h gluk. (mM)	inzulín na lačno (pmol/l)	Glyko-hemoglobín
IGT							
D01	M	50	25,7	5,78	8,99	54,84	5,8
D02	Ž	52	26,8	5,94	10,52	79,80	5,7
D03	M	49	32,2	5,73	9,45	73,68	6,3
D04	M	42	30,6	5,99	9,89	35,52	5,9
D05	M	46	38,2	6,14	11,06	92,88	6,5
priem. ±s.o.		47,8 ±1,7	30,7 ± 2,2	5,92 ±0,07	9,98 ±0,37	67,3 ±10,0	6,04 ±0,15
NIDDM							
D06	M	53	26,4	8,81	16,27	30,78	6,7
D07	M	61	27,9	6,87	11,28	81,60	7,2
D08	M	60	34,2	7,66	15,05	37,44	5,9
D09	M	53	27,8	6,86	18,66	47,88	7,7
D10	M	66	23,9	8,34	12,9	24,84	8,1
priem. ±s.o.		58,6 ±2,5	28,1 ±1,7	7,71 ±0,39	14,83 ±1,29	44,5 ±10,0	7,12 ±0,39
hodn. P		P < 0,009	P = 0,36	P < 0,002	P < 0,007	P = 0,15	P < 0,04

Hladiny glukózy v plazme boli merané metódou využívajúcou glukóza oxidázu (YSI, 1500 G, Schlag Company, Bergish-Gladbach, Nemecko). Koeficient variácie tejto metódy bol <2%. Inzulín v plazme bol meraný s použitím Abbottovej mikročasticovej enzýmovej imunoanalýzy. Priemerný koeficient variácie vo vnútri hodnotenia bol 5 %. C-peptid v plazme bol meraný ako už bolo opísané v (22), Faber OK, Binder C, Markussen J, Heding Lg, Naithani VK, Kuzuya H, Blix P, Horwitz DL, Rubenstein AH: Characterization of seven c-peptide antisera, *Diabetes* 27, Suppl 1:170-177, 1978. Spodný limit citlivosti stanovenia bol 0,02 pmol/ml a koeficient variácie vo vnútri stanovenia v priemere 6 %. Gluka-

gón bol meraný pomocou komerčne dostupného kitu pre rádioimunoanalýzu (Biermann, Bad Nauheim, Nemecko) a koeficient variácie vo vnútri stanovenia bol v priemere 8 %. IR-GLP-1 bol meraný pomocou špecifickej polyklonálnej protilátky GA 1178 (Affinity Research, Nottingham, UK) (23). Tá vykazovala 100% reaktivitu s GLP-1 (1-36) amidom a so skráteným GLP-1 (7-36) amidom. Imunoreaktívny materiál podobný GLP-1 bol odstránený zo vzoriek plazmy na náplniach C-18 s využitím acetonitrilu pre elúciu vzoriek. Detekčný limit stanovenia bol 2 fmol/tuba. Antisérum nevykazovalo krížové reakcie s GIP, pankreatickým glukagónom, glicentínom, oxyntomodulínom alebo GLP-2. Koeficienty variácie vo vnútri a medzi stanoveniami boli 3,4 %, resp. 10,4 %.

Všetky výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm SEM (smerodajná odchýlka, s.o.). Analýza dát bola uskutočňovaná s použitím štatistického analytického systému (SAS Version 6 Edition, for Personal Computers, SAS Institute, Inc., Cary, NC). Význam rozdielov vo vnútri jednotlivých indukcií pomocou infúzie GLP-1 bol stanovený s použitím párových t testov. Rozdiely boli považované za významné pokiaľ bolo $P < 0,05$.

Boli použité štandardné kinetické parametre pre odstránenie (clearance) C-peptidu upravené pre vek, pohlavie a plochu povrchu tela (24), Van Cauter E, Mestrez F, Sturis J, Polonsky KS. Odhad rýchlosti vylučovania inzulínu z hladín C-peptidu: porovnanie individuálnych a štandardných kinetických parametrov pre odstránenie C-peptidu: *Diabetes* 41:368-377, 1992. Tieto parametre boli použité na odvodenie ISR z koncentrácií C-peptidu v plazme pomocou dekonvolúcie, ako už bolo opísané v (25,26), v 15 minútových intervaloch, čo zodpovedalo intervalom medzi odbermi vzoriek krvi.

Subjekty s diabetes boli liečené iba diétou s výnimkou subjektu D07, ktorý bol predtým liečený ústne podávaným hypoglykemickým prípravkom, ktorého podávanie bolo prerušené 4 týždne pred štúdiou. Žiadnemu z diabetických pacientov nebol nikdy podaný inzulín. U všetkých subjektov bola dva týždne pred štúdiou zahájená diéta na udržanie hmotnosti obsahujúca prinajmenšom 200 g karbohydrátov denne.

Každý subjekt bol sledovaný v troch oddelených prípadoch. Všetky štúdie boli uskutočňované po 12 hodín trvajúcim hladovaním cez noc začínajúc pri 0700, pokiaľ nie je uvedené inak, v prípade ležiacich subjektov. Na každé predlaktie bol umiestnený intravenózný katéter, jeden na odoberanie vzoriek krvi a druhý na podávanie glukózy a GLP-1 podľa potreby. Pri všetkých experimentoch bola ruka so vzorkovacím katétrom udržiavaná vo vyhrievanej prikrývke, aby sa zaisťovala arterializácia žilovej krvi. V nasledujúcich príkladoch bol GLP-1 podávaný subjektom vo forme GLP-1 (7-36) amidu.

Príklad 2: Test na toleranciu k ústne podávanej glukóze

Boli odoberané vzorky krvi na meranie glukózy, C-peptidu, inzulínu, glukagónu a GLP-1 v 30 minútových intervaloch počas 120 minút, potom čo bolo podané 75 mg glukózy (Boehringer Mannheim, Mannheim, Nemecko). Boli vypočítané zmeny plôch pod krivkou (AUC) od 0 do 120 minút pre glukózu, C-peptid, glukagón a GLP-1. Koncentrácie glukózy boli použité na definovanie stupňa intolerancie glukózy podľa kritérií Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO). Odozva skupiny s IGT a s NIDDM na ústne podanú glukózu je zhrnutá v tabuľke 3.

Odozvy glukózy, inzulínu a GLP-1 u subjektov po podaní 75 mg glukózy ukazuje obrázok 1. Hodnota AUC pre glukózu od 0 do 120 minút bola nižšia v skupine s IGT, ale AUC pre inzulín, C-peptid, glukagón a GLP-1 sa nelišili.

Tabuľka 3

Odozva na glukózu podanú ústami

2 h AUC	IGT n=5	NIDDM n=5
glukóza (mM.min/l)	1290 ± 41	1628 ± 76*
inzulín (pmol.min/l)	53.750 ± 10.648	26.083 ± 10.047
C-peptid (pmol.min/l)	293 ± 40	180 ± 48
glukagón (ng. min/l)	8130 ± 1324	6858 ± 920
GLP-1 (pmol. min/l)	805 ± 141	983 ± 111

$P < 0,05$ pre IGT vs NIDDM

Keď boli priemery ISR vynesené oproti priemerným hladinám glukózy, pozorovalo sa, že GLP-1 spôsobuje významné zníženie hladín glukózy bez významnejších zmien priemerov rýchlostí vylučovania inzulínu (obrázok 2).

Príklad 3: Podávanie oscilujúcej glukózovej infúzie

Periferálne podávanie glukózy v oscilujúcom móde spôsobilo pravidelné oscilácie glukózy v plazme. V normálnych subjektoch sú β -bunky schopné detegovať a odpovedať na opakované zvyšovanie a znižovanie koncentrácie glukózy súbežnými zmenami vylučovania inzulínu. Táto úprava oscilácií vylučovania inzulínu v závislosti od oscilácií glukózy sa nazýva "vyškolenie" (entrainment). Nedostatok vyškolenia na glukózu je prejavom dysfunkcie β -buniek u osôb s IGT a miernym NIDDM.

Použili sme protokol nízko dávkovej oscilujúcej glukózovej infúzie, pretože je to veľmi citlivý test schopnosti β -buniek vnímať a odpovedať na malé zmeny koncentrácií plazmatickej glukózy. Tento test skúša integritu spätnoväzbovej slučky spojujúcej glukózu a vylučovanie inzulínu. Normálna odpoveď vyžaduje neporušenú schopnosť vnímať glukózu.

Aby sa určilo, či boli β -bunky schopné detegovať oscilácie glukózy a odpovedať na ne, bola infúzia glukózy uskutočňovaná v oscilačnom móde s malým objemom salinického roztoku počas 12 hodín. Amplitúda podávaných oscilácií bola 33 % nad a pod priemernou hodnotou 4 mg/kg/min a ich periodičita bola 144 minút.

Aby sa stanovil účinok GLP-1 na schopnosť β -buniek odpovedať na oscilácie glukózy, bola infúzia glukózy uskutočňovaná rovnakým spôsobom a GLP-1 sa podávalo v infúzii konštantnou rýchlosťou 0,4 pmol/kg/min počas celých 12 hodín. Každá štúdia sa skladala z počiatočnej dvojhodinovej periódy (0700-0900), aby mohol byť dosiahnutý ustálený stav. Potom sa pokračovalo následnou

periódou trvajúcou 10 hodín (0900-1900), v priebehu ktorej boli v 15 minútových intervaloch odoberané vzorky krvi na stanovenie glukózy, inzulínu, C-peptidu a glukagónu a v 60 minútových intervaloch na stanovenie GLP-1.

Priemerné hladiny glukózy boli významne nižšie v oboch skupinách pri infúzii GLP-1 v porovnaní s infúziou soli, s priemerným poklesom $2,4 \pm 0,6$ mM u subjektov s IGT ($P < 0,02$) a $5,2 \pm 0,5$ mM u diabetikov ($P < 0,0005$). Napriek významnému zníženiu koncentrácie plazmatickej glukózy, neboli u oboch skupín priemery ISR významne odlišné v priebehu infúzie GLP-1 v porovnaní s infúziou salinického roztoku (tabuľka 4).

Tabuľka 4

Priemerné odozvy glukózy a ISR na 12 hodinovú infúziu soli alebo GLP-1

id. označ.	priem. gluk. 12 h inf. salin.	priem. gluk. 12 h inf. GLP-1	priem. ISR 12 h inf. salin.	priem. ISR 12 h inf. GLP-1
IGT				
D01	7,49	6,48	376,1	390,9
D02	8,34	6,06	457,9	465,9
D03	10,16	6,46	900,2	1042,7
D04	7,90	6,36	328,5	365,9
D05	10,06	6,37	798,0	1005,8
Priemer ±s.o.	8,79 ±0,56	6,35 ±0,08*	572,1 ±116,1	654,2 ±152,1
NIDDM				
D06	16,73	11,53	232,3	477,7
D07	17,28	10,51	640,3	715,4
D08	9,94	6,24	615,6	487,7
D09	13,95	8,84	366,5	412,5
D10	15,05	9,90	346,2	448,9
Priemer ±s.o.	14,59 ±1,3	9,40 ±0,9*	440,2 ±80,1	508 ±53,4

* $P < 0,05$, podľa párového t testu, vzťahuje sa k porovnaniu medzi infúziou salinického roztoku a GLP-1.

Priemerné hladiny inzulínu v priebehu infúzie GLP-1 v porovnaní s infúziou salinického roztoku boli tiež zachované; zvýšili sa o 102 ± 90 pmol/l s $P=0,32$ u subjektov s IGT a o 7 ± 12 pmol/L s $P=0,56$ u subjektov s NIDDM. Priemerné hladiny glukagónu sa tiež nelíšili v priebehu infúzie GLP-1 v porovnaní s infúziou salinického roztoku ($39,3 \pm 5,4$ pg/ml proti $39,4 \pm 5,9$ pg/ml; $P=0,94$) u subjektov s IGT ($46,4 \pm 3,2$ pg/ml proti $42,8 \pm 5,4$ pg/ml; $P=0,4$) u subjektov s NIDDM. Hladiny GLP-1 dosiahnuté v priebehu infúzie GLP-1 boli $15,46 \pm 4,6$ pmol/l v porovnaní s $2,0 \pm 0,8$ pmol/l v priebehu infúzie salinického roztoku. ($P<0,001$). Tieto úrovne zodpovedajú postprandiálnym fyziologickým hladinám.

Príklad 4: Vzťah medzi glukózou a ISR u jednotlivých subjektov s IGT

V normálnych subjektoch je každý pulz (náhla zmena koncentrácie) glukózy úzko spojený s pulzom ISR (odpoveď sekréciou inzulínu). Ako už bolo ukázané, je toto spojenie u subjektov s IGT poškodené. Profily glukózy a ISR v priebehu oscilujúcej glukózovej infúzie salinického roztoku sú od jedného reprezentatívneho subjektu s IGT, D02 ukázané na obrázkoch 3A a 3C. Tieto výsledky demonštrujú, že u subjektov s IGT sa v priebehu infúzie salinického roztoku stráca úzke spojenie medzi glukózou a ISR a dochádza k mnohým osciláciám v ISR, ktoré nezávisia od glukózy. V prítomnosti fyziologických postprandiálnych hladín GLP-1 (obrázky 3B a 3D) je model odpovedí vylučovaním inzulínu na glukózu zlepšený u subjektov s IGT tak, že každý pulz glukózy je nasledovaný pulzom v ISR. Tak GLP-1 zlepšuje schopnosť β -buniek reagovať na exogénnu infúziu glukózy u subjektov s IGT.

Príklad 5: Vzťah medzi glukózou a ISR u jednotlivých subjektov s NIDDM

Obrázok 4 ukazuje profily glukózy a ISR u jedného subjektu s NIDDM, D07. V znateľnom protiklade k subjektom s IGT, napriek zníženiu koncentrácií plazmatickej glukózy a zachovaniu ISR nebol v priebehu infúzie GLP-1 zlepšený

model odpovedí sekréciou inzulínu na glukózu (obrázky 4B a 4D) s mnohými pretrvávajúcimi osciláciami ISR nezávislými od glukózy. Profily glukózy a ISR v priebehu oscilujúcej glukózovej infúzie salinického roztoku ukazujú obrázky 4A a 4C.

Príklad 6: Efekt GLP-1 na spektrálnu silu v IGT a NIDDM

Aby sa zistilo, či bola u jednotlivých subjektov pomocou glukózy "nacvičená" sekrécia inzulínu, boli aktuálne profily sekrécie inzulínu analyzované spektrálnou analýzou. Analýza spektrálnej sily bola použitá na hodnotenie prítomnosti úzkej väzby medzi osciláciami koncentrácií glukózy a osciláciami v ISR. Táto metóda hodnotí pravidelnosť oscilácií sekrécie inzulínu pri vopred stanovenej frekvencii. Spektrálne píky zodpovedajú dominantnej periodicite a výšky píkov zodpovedajú spektrálnej sile. Každé spektrum bolo normalizované s predpokladom, že totálna variancia každej série je 100 % a bolo vyjadrené ako normalizovaná spektrálna sila.

Priemerná normalizovaná spektrálna sila pre glukózu u subjektov s IG bola $11,2 \pm 1,5$ v priebehu infúzie salinického roztoku a $13,2 \pm 1,6$ v priebehu infúzie s GLP-1 ($P=0,19$) a u subjektov s NIDDM $6,5 \pm 1,8$ v priebehu infúzie salinického roztoku a $9,8 \pm 0,7$ v priebehu infúzie s GLP-1 ($P=0,18$). Obrázok 5 jasne demonštruje, že infúzia GLP-1 u subjektov s IGT zlepšila odpovede sekréciou inzulínu na oscilácie plazmatickej glukózy, čo viedlo k väčšiemu stupňu "nacvičenia" sekrécie inzulínu v odpovedi na glukózu. Tento účinok bol kvantifikovaný porovnaním normalizovanej spektrálnej sily profilov vylučovania inzulínu. Spektrálna sila pre ISR sa zvýšila z $2,9 \pm 1,4$ v priebehu soľnej infúzie na $8,9 \pm 1,7$ v priebehu infúzie s GLP-1; ($P<0,006$) a nebola zmenená u subjektov s NIDDM ($1,1 \pm 0,5$ na $1,5 \pm 0,8$; $P=0,6$).

Spektrálna analýza oscilujúcich glukózových profilov potvrdila existenciu píkov v spektre plazmatickej glukózy pri 144 minútach zodpovedajúcich perióde exogénnej glukózovej infúzie. Jednotlivé spektrálne sily pre glukózu a ISR v

jednom subjekte s IGT (obrázok 6A) a v jednom subjekte s NIDDM (obrázok 6B) v priebehu soľnej infúzie a v priebehu infúzie GLP-1 sú ukázané na obrázku 6. Tieto dáta zodpovedajú dátam, ktoré ukazujú obrázky 3C a 3D a obrázky 4A a 4B. Spektrálna sila sa zvýšila z 0,6 na 8,9 u subjektu s IGT a bola minimálne zmenená z 0,28 na 1,51 u subjektu s NIDDM. Píky sa v spektre plazmatickej glukózy objavili pri 144 minútach. V priebehu soľnej infúzie sa dominantný spektrálny pík pre ISR nevyskytoval pri 144 minútach, ale skôr bol pri 0,2. Spektrálna sila s infúziou GLP-1 bola 1,5.

V priebehu infúzie salinického roztoku bolo slabé "vyškolenie" (obr. 3A), čomu zodpovedá, že spektrálna sila pre ISR pri 144 bola 0,6. V priebehu infúzie GLP-1 (obr. 3B) sa periodicita dominantného spektrálneho píku v ISR vyskytovala pri 144 minútach, čo demonštruje, že GLP-1 spôsobilo vyškolenie β -buniek v tomto subjekte.

Priemerná hodnota normalizovanej spektrálnej sily v kontrolných subjektoch (index telesnej hmotnosti BMI 28,3) s normálnou toleranciou glukózy bola $7,2 \pm 0,6(9)$.

Výsledky tejto štúdie ukázali, že kontinuálne infúzie fyziologických postprandiálnych hladín GLP-1 redukovali koncentrácie plazmatickej glukózy a stimulovali sekréciu inzulínu u subjektov s IGT a NIDDM. Najdôležitejšie je, že GLP-1 obnovil schopnosť β -buniek vnímať a odpovedať na plazmatickú glukózu vo všetkých subjektoch s IGT (kvantifikované normalizovanou spektrálnou silou), s meniacou sa odpoveďou u subjektov s už rozvinutým stavom NIDDM.

Možný mechanizmus, ktorým je u β -buniek zlepšená funkcia pomocou GLP-1 zahrnuje reguláciu prvkov citlivých na glukózu, elimináciu glukotoxicity a zlepšenie inzulínovej rezistencie. GLP-1 a glukóza vykazujú synergické inzulínotropne účinky na β -bunky zahrnujúce stimuláciu tvorby cyklického AMP, vylučovania inzulínu, biosyntézy inzulínu a expresiu génu kódujúceho proinzulín.

Tieto príklady ukazujú, že kontinuálna infúzia fyziologických hladín GLP-1 znižuje koncentrácie plazmatickej glukózy a stimuluje vylučovanie inzulí-

nu u subjektov s IGT a NIDDM. Najdôležitejšie je, že GLP-1 obnovuje schopnosť β -buniek vnímať a odpovedať na malé zmeny koncentrácií plazmatickej glukózy u subjektov s IGT a len s premenlivou odozvou u subjektov s NIDDM. U subjektov s IGT sme pozorovali významné zvýšenie spektrálnej sily, meranie funkcie β -buniek, ktoré nezáviselo od nastavenia pre zmeny citlivosti na inzulín.

ZOZNAM SEKVENCIÍ

<110> Goke, Burkhard

Byrne, Maria

<120> Glucagon-Like Peptide-1 Improves the Ability of the

B-Cell to Sense and Respond to Glucose in Subjects with

Impaired Glucose Tolerance

(Glukagónu podobný peptid-1 zlepšuje odpoveď β -buniek na glukózu u subjektov so zhoršenou toleranciou glukózy)

<130> P03986W00.

<140> PCT/US99/10040

<141> 1999-05-07

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> cicavčí

<400> 1

His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val

5 10 15

Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu

20

25

30

Val Lys Gly Arg Gly

35

<210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> cicavčí

<400> 2

His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val

1

5

10

15

Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu

20

25

30

Val Lys Gly Arg

35

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

<213> cicavčí

<400> 3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20

25

30

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> cicavčí.

<400> 4

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20

25

30

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> cicavčí

<400> 5

Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala

1 5 10 15

Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

20 25

<210> 6

<211> 28

<212> PRT

<213> cicavčí

<400> 6

Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala

1 5 10 15

Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg

20 25

<210> 7

<211> 39

<212> PRT

<213> Heloderma suspectum

<400> 7

His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20

25

30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 8

<211> 31

<212> PRT

<213> *Heloderma suspectum*

<400> 8

Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu

1

5

10

15

Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

20

25

30

<210> 9

<211> 39

<212> PRT

<213> *Heloderma suspectum*

<400> 9

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu

1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser

20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

35

<210> 10

<211> 38

<212> PRT

<213> Heloderma suspectum

<400> 10

His Ser Asp Ala Thr Phe Thr Ala Glu Tyr Ser Lys Leu Leu Ala Lys

1 5 10 15

Leu Ala Leu Gln Lys Tyr Leu Glu Ser Ile Leu Gly Ser Ser Thr Ser

20 25 30

Pro Arg Pro Pro Ser Ser

35

<210> 11

<211> 37

<212> PRT

<213> Heloderma suspectum

<400> 11

His Ser Asp Ala Thr Phe Thr Ala Glu Tyr Ser Lys Leu Leu Ala Lys

1 5 10 15

Leu Ala Leu Gln Lys Tyr Leu Glu Ser Ile Leu Gly Ser Ser Thr Ser

20 25 30

Pro Arg Pro Pro Ser

35

<210> 12

<211> 35

<212> PRT

<213> Heloderma suspectum

<400> 12

His Ser Asp Ala Ile Phe Thr Glu Glu Tyr Ser Lys Leu Leu Ala Lys

1 5 10 15

Leu Ala Leu Gln Lys Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Gly Ser Arg Thr Ser

20 25 30

Pro Pro Pro

35

<210> 13

<211> 35

<212> PRT

<213> Heloderma suspectum .

<400> 13

His Ser Asp Ala Ile Phe Thr Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Leu Ala Lys

1

5

10

15

Leu Ala Leu Gln Lys Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Gly Ser Arg Thr Ser

20

25

30

Pro Pro Pro

35

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Kompozícia, vyznačujúca sa tým, že zahrnuje zlúčeninu, ktorá sa viaže na receptor pre "GLP-1", a farmaceutický nosič, pričom je uvedená zlúčenina prítomná v množstve efektívnom na zvýšenie citlivosti a odpovede pankreatických β -buniek na zmeny v plazmatickej glukóze, merané časovaním a množstvom sekrécie inzulínu v odpovedi na zvýšenú plazmatickú glukózu u človeka so zhoršenou toleranciou glukózy.
2. Kompozícia podľa nároku 1, vyznačujúca sa tým, že zlúčenina viažuca sa na receptor je zvolená ako (a) peptid, ktorý zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu glukagónu podobného peptidu-1, alebo (b) variantný peptid zahrnujúci aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši od sekvencie glukagónu podobného peptidu-1 jednou alebo viacerými substitúciami, deléciami alebo inzerciami.
3. Kompozícia podľa nároku 2, vyznačujúca sa tým, že receptor viažuca zlúčenina je glukagónu podobný peptid-1.
4. Kompozícia podľa nároku 2, vyznačujúca sa tým, že receptor viažuca zlúčenina je glukagónu podobný peptid-1 (7-37), ktorý má sekvenciu His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly (SEQ.ID NO:3).
5. Kompozícia podľa nároku 2, vyznačujúca sa tým, že receptor viažuca zlúčenina je glukagónu podobný peptid-1 (7-36) amid, ktorý má sekvenciu

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln
Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg (NH₂) (SEQ.ID
NO:4)

6. Kompozícia podľa nároku 2, **vyznačujúca sa tým**, že receptor viažuca zlúčenina je variantný peptid, v ktorom sa kombinácia substitúcií, delácií a inzercii v sekvencii aminokyselín nelíši viac ako 10 aminokyselinami od aminokyselinovej sekvencie glukagónu podobného peptidu-1.
7. Kompozícia podľa nároku 1, **vyznačujúca sa tým**, že ďalej zahrnuje činidlo, ktoré zvyšuje polčas životnosti zlúčeniny *in vivo*.
8. Kompozícia podľa nároku 1, **vyznačujúca sa tým**, že receptor viažuca zlúčenina je exprimovaná polynukleotidom.
9. Kompozícia podľa nároku 1, **vyznačujúca sa tým**, že receptor viažuca zlúčenina je organická molekula, ktorej molekulová hmotnosť nepresahuje asi 5000.
10. Spôsob liečenia jedinca so zhoršenou toleranciou glukózy, **vyznačujúci sa tým**, že zahrnuje podávanie kompozície zahrnujúcej zlúčeninu viažucu sa na receptor pre glukagónu podobný peptid-1 a farmaceutický nosič, toľmuto jedincovi, kde uvedená kompozícia obsahuje množstvo uvedenej zlúčeniny efektívne na zvýšenie pravidelnosti inzulínových odpovedí a ich amplitúdy v reakcii na zmeny v plazmatickej glukóze.

11. Spôsob podľa nároku 10, **vyznačujúci sa tým**, že receptor viažuca zlúčenina je vybraná ako (a) peptid, ktorý zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu glukagónu podobného peptidu-1, alebo (b) variantný peptid zahrnujúci aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši od sekvencie glukagónu podobného peptidu-1 jednou alebo viacerými substitúciami, deléciami alebo inzerciami.
12. Spôsob podľa nároku 11, **vyznačujúci sa tým**, že receptor viažuca zlúčenina je glukagónu podobný peptid-1.
13. Spôsob podľa nároku 11, **vyznačujúci sa tým**, že receptor viažuca zlúčenina je glukagónu podobný peptid-1(7-37), ktorý má sekvenciu His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly (SEQ.ID NO:3).
14. Spôsob podľa nároku 11, **vyznačujúci sa tým**, že receptor viažuca zlúčenina je glukagónu podobný peptid-1 (7-36) amid, ktorý má sekvenciu His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg (NH₂) (SEQ.ID NO:4).
15. Spôsob podľa nároku 11, **vyznačujúci sa tým**, že receptor viažuca zlúčenina je variantný peptid, v ktorom sa kombinácia substitúcií, delécií a inzercií v sekvencii aminokyselín nelíši viac ako 10 aminokyselinami od aminokyselinovej sekvencie glukagónu podobného peptidu-1.

16. Spôsob podľa nároku 10, vyznačujúci sa tým, že receptor viažuca zlúčenina je exprimovaná polynukleotidom.
17. Spôsob podľa nároku 10, vyznačujúci sa tým, že receptor viažuca zlúčenina je organická molekula, ktorej molekulová hmotnosť nepresahuje asi 5000.
18. Spôsob podľa nároku 10, vyznačujúci sa tým, že krok podávania je vybraný zo skupiny pozostávajúcej zo spôsobov: intravenózneho, podkožného, vnútro svalového, interperitoneálneho, injekčnej dávky s dlhotrvajúcim uvoľňovaním, hlbokým vdýchnutím pľúcami s dlhotrvajúcim uvoľňovaním, bukálneho podania a podania pomocou náplasti.
19. Spôsob podľa nároku 10, vyznačujúci sa tým, že ďalej zahrnuje podávanie činidla, ktoré zvyšuje polčas životnosti *in vivo* uvedenej receptor viažucej zlúčeniny.
20. Spôsob podľa nároku 19, vyznačujúci sa tým, že uvedené činidlo je podávané súbežne s kompozíciou.
21. Spôsob podľa nároku 19, vyznačujúci sa tým, že uvedené je činidlo kovalentne viazané na receptor viažucu zlúčeninu.
22. Spôsob podľa nároku 18, vyznačujúci sa tým, že vnútrožilové podávanie je v rozmedzí dávky od asi 0,3 do asi 2,0 pmol/kg za minútu.

23. Spôsob podľa nároku 18, **vyznačujúci sa tým**, že kontinuálne podkožné podávanie je v rozmedzí dávky od asi 1,0 do asi 20,0 pmol/kg za minútu.
24. Spôsob liečenia človeka so zhoršenou toleranciou glukózy, **vyznačujúci sa tým**, že zahrnuje podávanie kompozície obsahujúcej zlúčeninu, ktorá sa viaže na receptor pre glukagónu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič, človeku, kde uvedená kompozícia obsahuje množstvo uvedenej zlúčeniny efektívne na spomalenie alebo zabránenie straty kontroly plazmatickej glukózy a vzniku diabetes mellitus nezávisiacej od inzulínu.
25. Spôsob podľa nároku 24, **vyznačujúci sa tým**, že receptor viažuca zlúčenina je vybraná ako (a) peptid, ktorý zahrnuje aminokyselinovú sekvenciu glukagónu podobného peptidu-1, alebo (b) variantný peptid zahrnujúci aminokyselinovú sekvenciu, ktorá sa líši od sekvencie glukagónu podobného peptidu-1 jednou alebo viacerými substitúciami, deléciami alebo inzerciami.
26. Spôsob podľa nároku 25, **vyznačujúci sa tým**, že receptor viažuca zlúčenina je glukagónu podobný peptid-1.
27. Spôsob podľa nároku 25, **vyznačujúci sa tým**, že receptor viažuca zlúčenina je glukagónu podobný peptid-1 (7-37), ktorý má sekvenciu His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly (SEQ.ID NO:3).
28. Spôsob podľa nároku 25, **vyznačujúci sa tým**, že receptor viažuca zlúčenina je glukagónu podobný peptid-1 (7-36) amid, ktorý má sekvenciu

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln
Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg (NH₂) (SEQ.ID
NO:4).

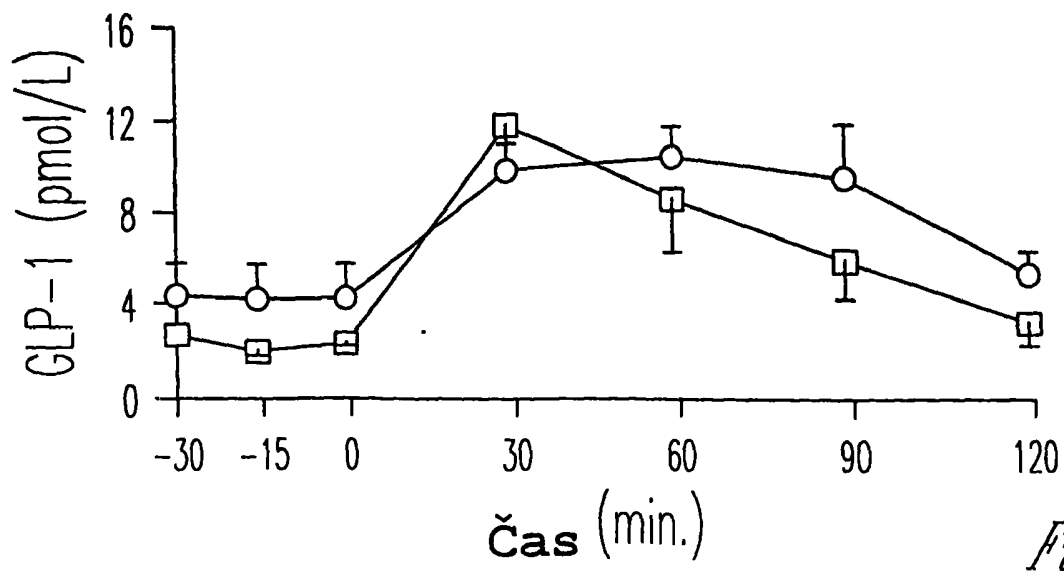
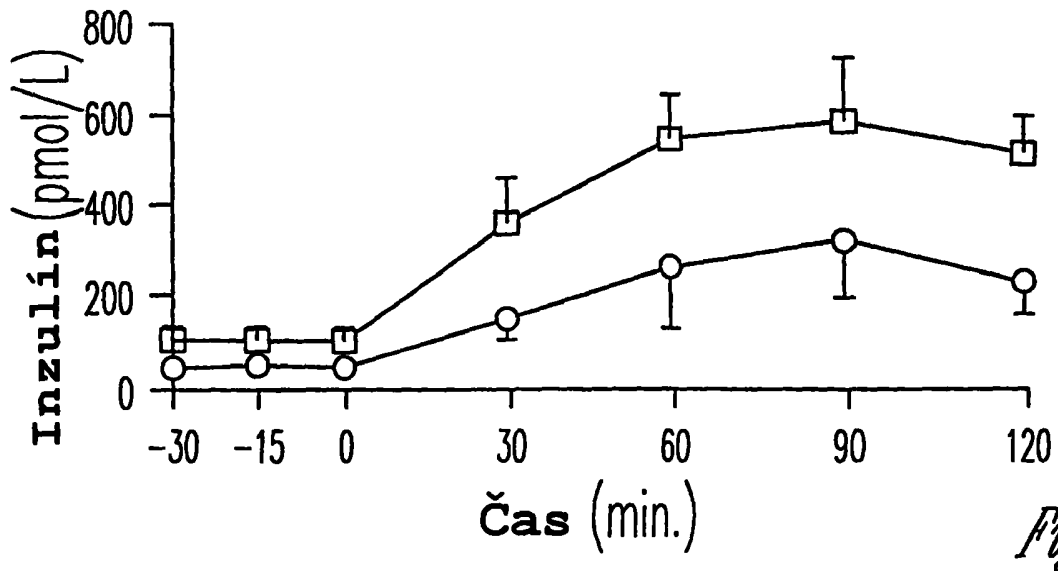
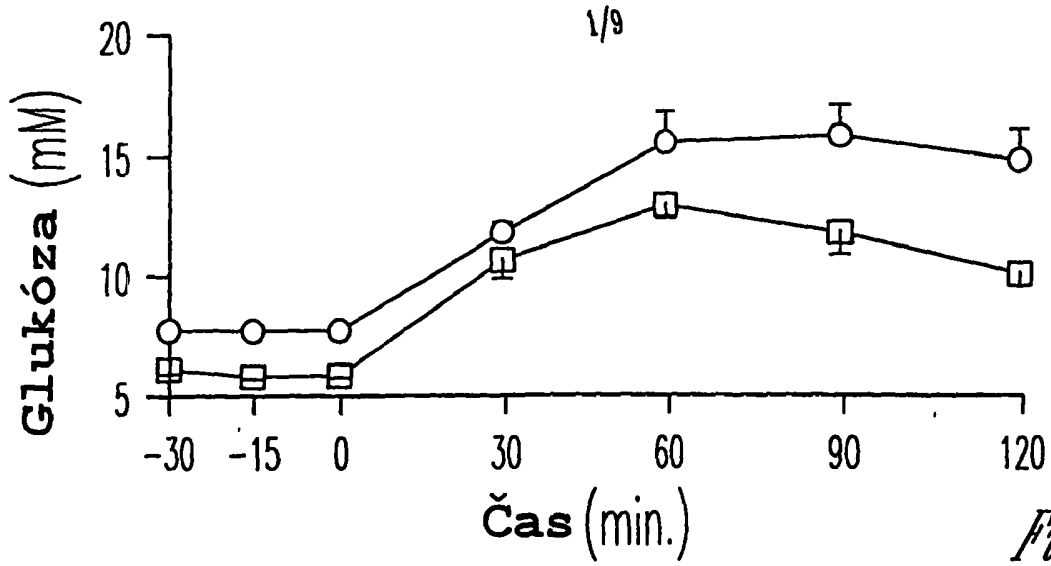
29. Spôsob podľa nároku 25, vyznačujúci sa tým, že receptor viažuca zlúčenina je variantný peptid, v ktorom sa kombinácia substitúcií, delácií a inzercií v sekvencii aminokyselín nelíši viac ako piatimi aminokyselinami od aminokyselinovej sekvencie glukagónu podobného peptidu-1.
30. Spôsob podľa nároku 24, vyznačujúci sa tým, že receptor viažuca zlúčenina je exprimovaná polynukleotidom.
31. Spôsob podľa nároku 24, vyznačujúci sa tým, že receptor viažuca zlúčenina je organická molekula, ktorej molekulová hmotnosť nepresahuje asi 5000.
32. Spôsob podľa nároku 24, vyznačujúci sa tým, že krok podávania je vybraný zo skupiny pozostávajúcej zo spôsobov: intravenózneho, podkožného, vnútro svalového, interperitoneálneho, injekčnej dávky s dlhotrvajúcim uvoľňovaním, hlbokým vdychnutím pľúcami s dlhotrvajúcim uvoľňovaním, bukálneho podania a podania pomocou náplasti.
33. Spôsob podľa nároku 32, vyznačujúci sa tým, že vnútrožilové podávanie je v rozmedzí dávky od asi 0,1 do asi 10,0 pmol/kg za minútu.

34. Spôsob podľa nároku 32, **vyznačujúci sa tým**, že kontinuálne podávanie pod kožu je v rozmedzí dávky od asi 0,1 do asi 75,0 pmol/kg za minútu.
35. Spôsob liečenia jedinca so zhoršenou toleranciou glukózy, **vyznačujúci sa tým**, že zahrnuje podávanie kompozície obsahujúcej zlúčeninu, ktorá sa viaže na receptor pre glukagónu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič tomuto jedincovi, kde uvedená kompozícia obsahuje množstvo uvedenej zlúčeniny efektívne na zlepšenie "vyškolenia" β -buniek, aby vylučovali inzulín v odpovediach na exogénne oscilácie glukózy.
36. Spôsob liečenia jedinca so zhoršenou toleranciou glukózy, **vyznačujúci sa tým**, že zahrnuje podávanie kompozície obsahujúcej zlúčeninu, ktorá sa viaže na receptor pre glukagónu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič tomuto jedincovi, kde uvedená kompozícia obsahuje množstvo uvedenej zlúčeniny efektívne na zlepšenie normalizácie modelu vylučovania inzulínu pri zhoršenej tolerancii glukózy.
37. Spôsob liečenia jedinca so zhoršenou toleranciou glukózy, **vyznačujúci sa tým**, že zahrnuje podávanie kompozície obsahujúcej zlúčeninu, ktorá sa viaže na receptor pre glukagónu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič tomuto jedincovi, kde uvedená kompozícia obsahuje množstvo uvedenej zlúčeniny efektívne na zníženie hladín inzulínu v plazme u jedinca so zhoršenou toleranciou glukózy.
38. Spôsob liečenia jedinca so zhoršenou toleranciou glukózy, **vyznačujúci sa tým**, že zahrnuje podávanie kompozície obsahujúcej zlúčeninu, ktorá sa viaže na receptor pre glukagónu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič tomuto jedincovi, kde uvedená kompozícia obsahuje množstvo uvedenej

zlúčeniny efektívne na zníženie inzulínovej rezistencie u jedinca so zhoršenou toleranciou glukózy.

39. Spôsob liečenia jedinca so zhoršenou toleranciou glukózy, **vyznačujúci sa tým**, že zahrnuje podávanie kompozície obsahujúcej zlúčeninu, ktorá sa viaže na receptor pre glukagónu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič, tomuto jedincovi, kde uvedená kompozícia obsahuje množstvo uvedenej zlúčeniny efektívne na zlepšenie pravidelnosti inzulínových odpovedí a ich amplitúdy v reakcii na zmeny v plazmatickej glukóze a na redukciu hladín inzulínu v plazme.

40. Spôsob liečenia jedinca, ktorého symptómy indikujú zvýšené riziko mozgovej cievnej príhody, **vyznačujúci sa tým**, že zahrnuje podávanie kompozície obsahujúcej zlúčeninu, ktorá sa viaže na receptor pre glukagónu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič tomuto jedincovi, kde uvedená kompozícia obsahuje množstvo uvedenej zlúčeniny efektívne na zlepšenie pravidelnosti inzulínových odpovedí a ich amplitúdy v reakcii na zmeny v plazmatickej glukóze a na redukciu hladín inzulínu v plazme.



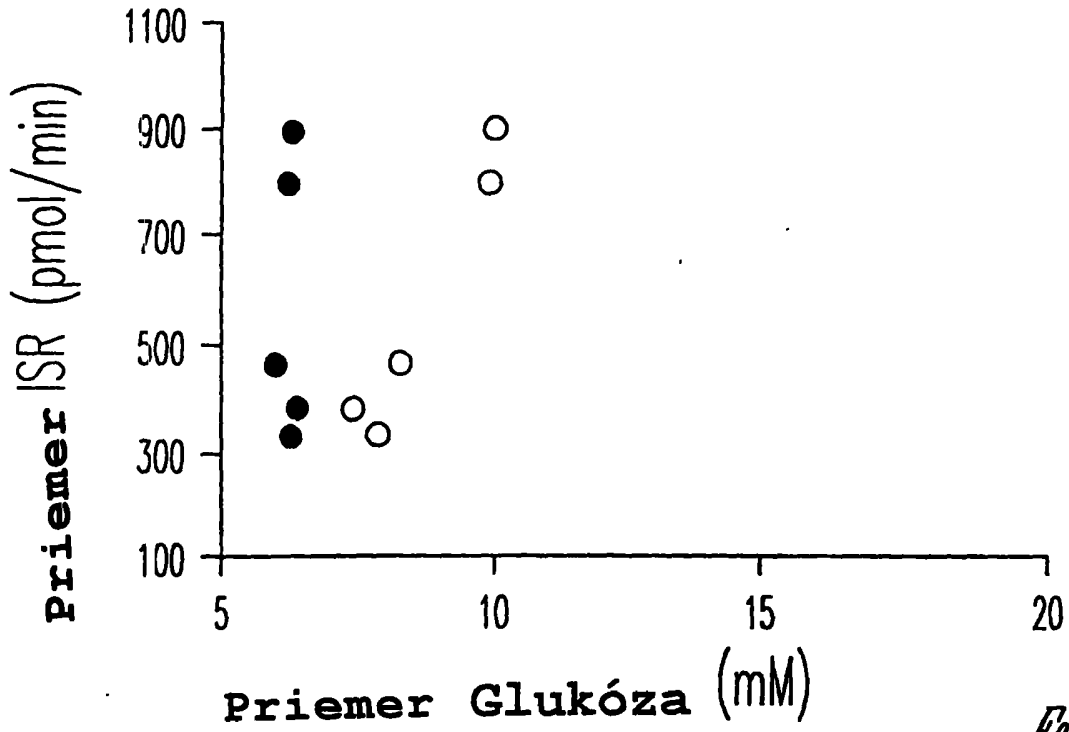


Fig. 2A

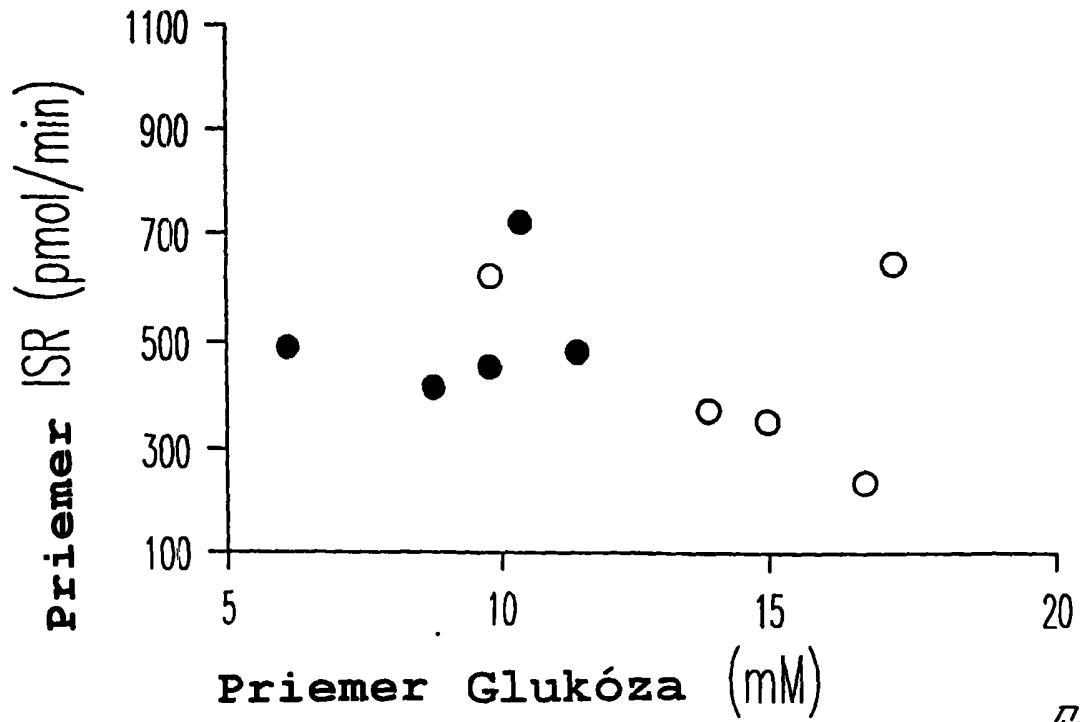


Fig. 2B

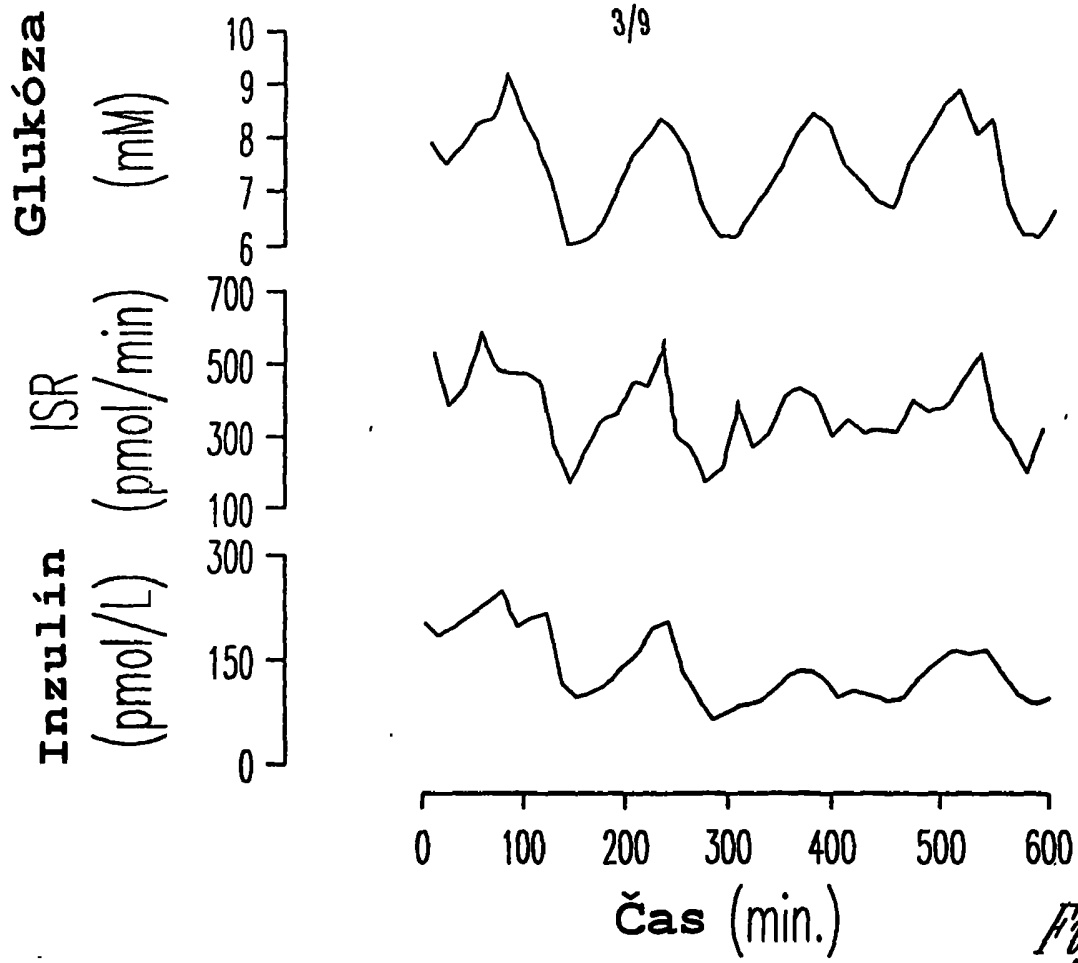


Fig. 3A

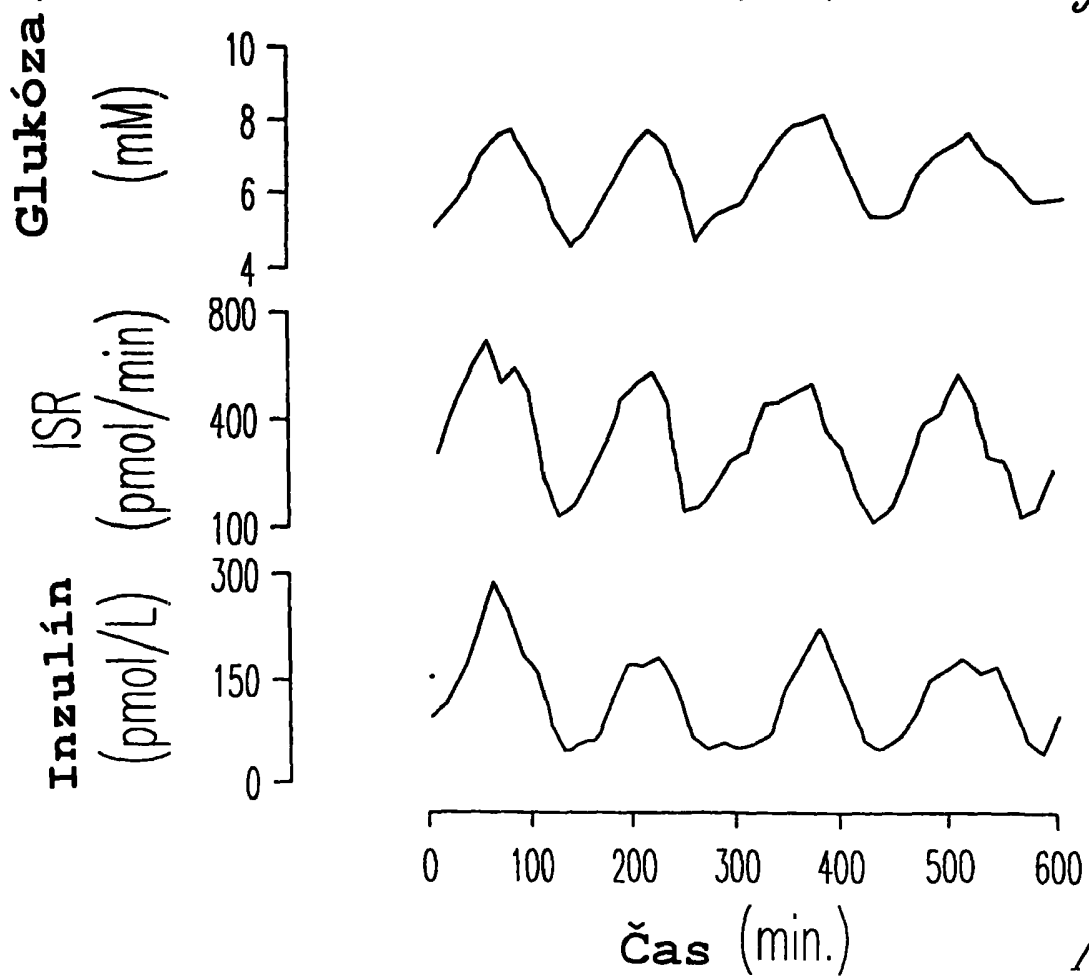


Fig. 3B

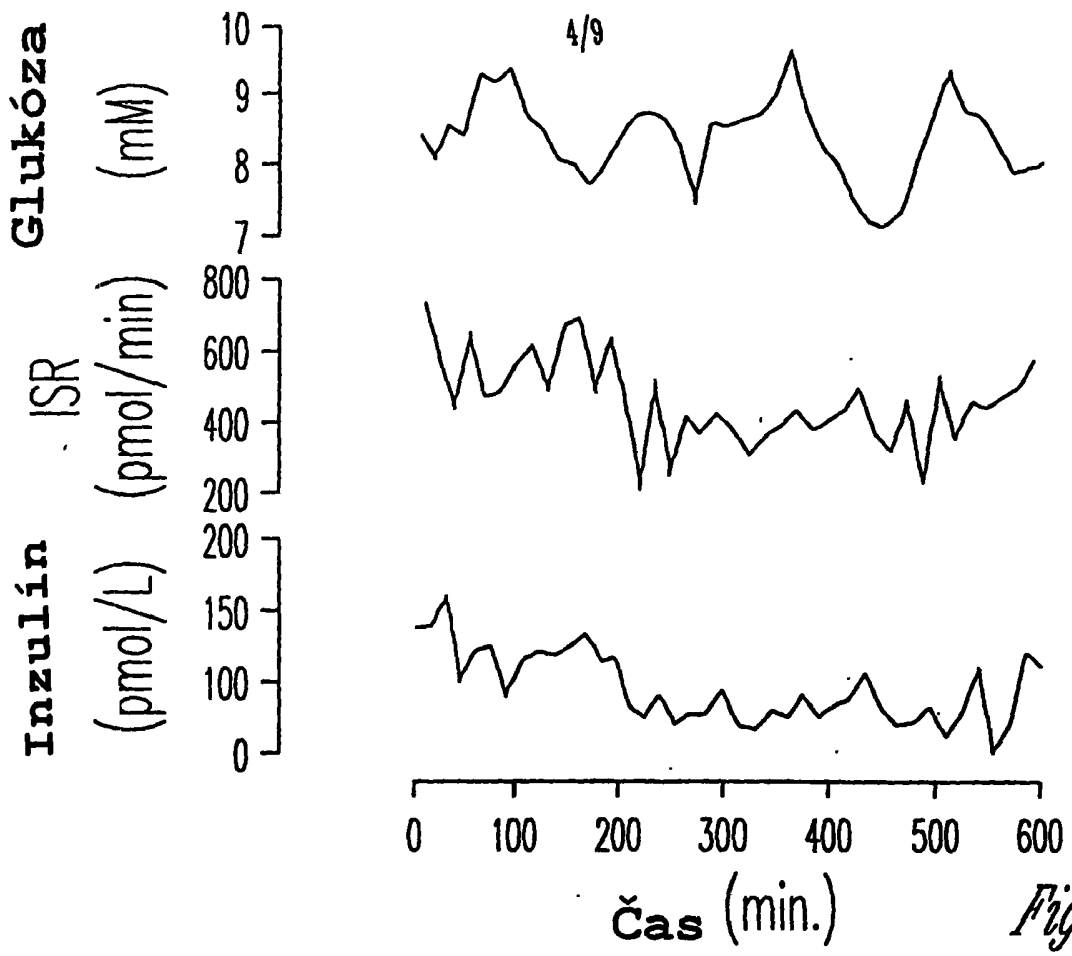


Fig. 3C

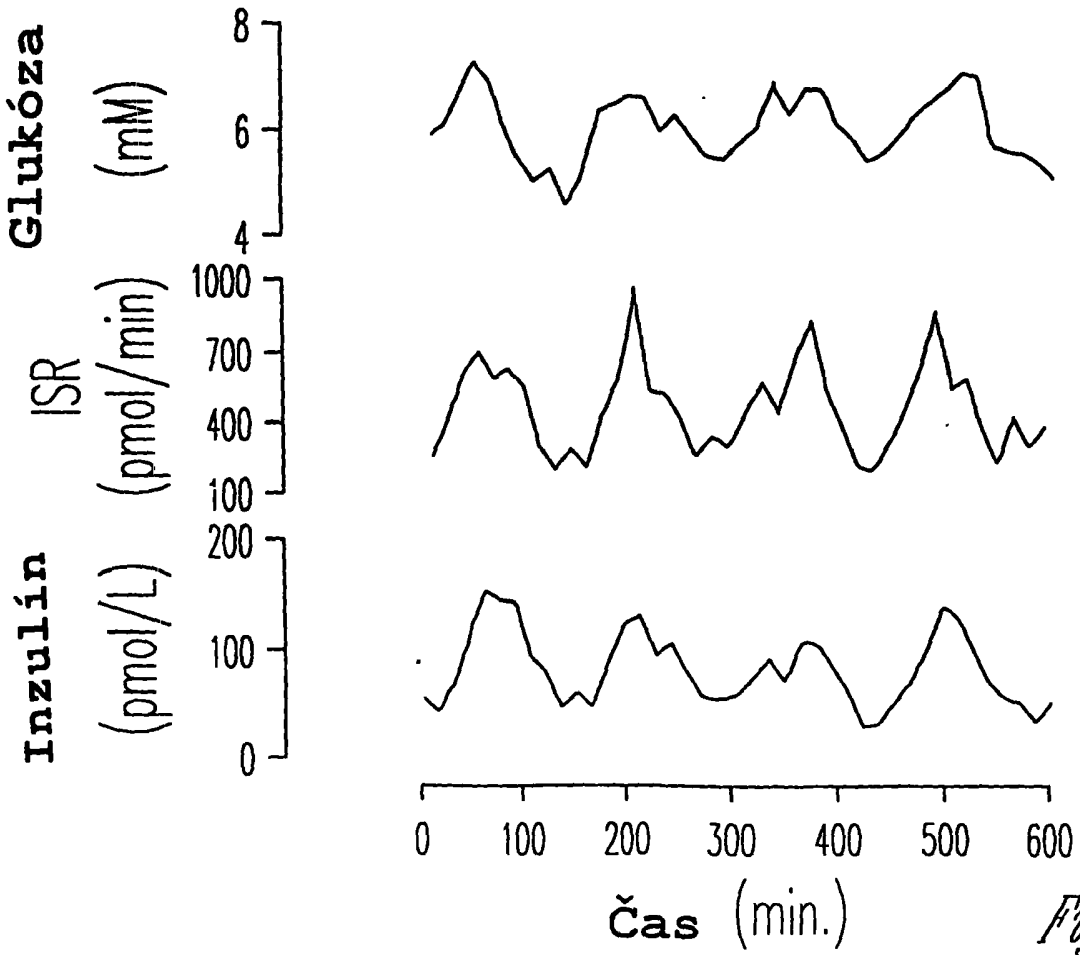


Fig. 3D

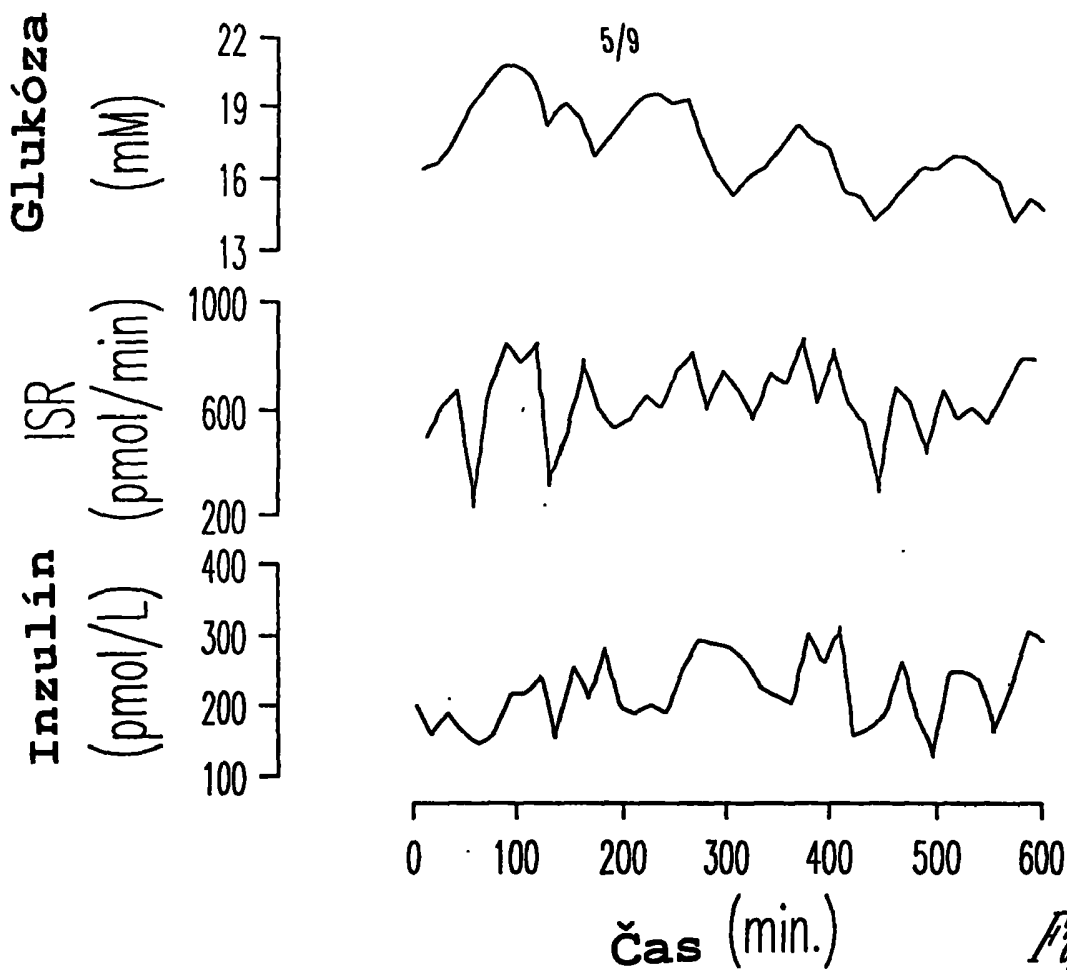


Fig. 4A

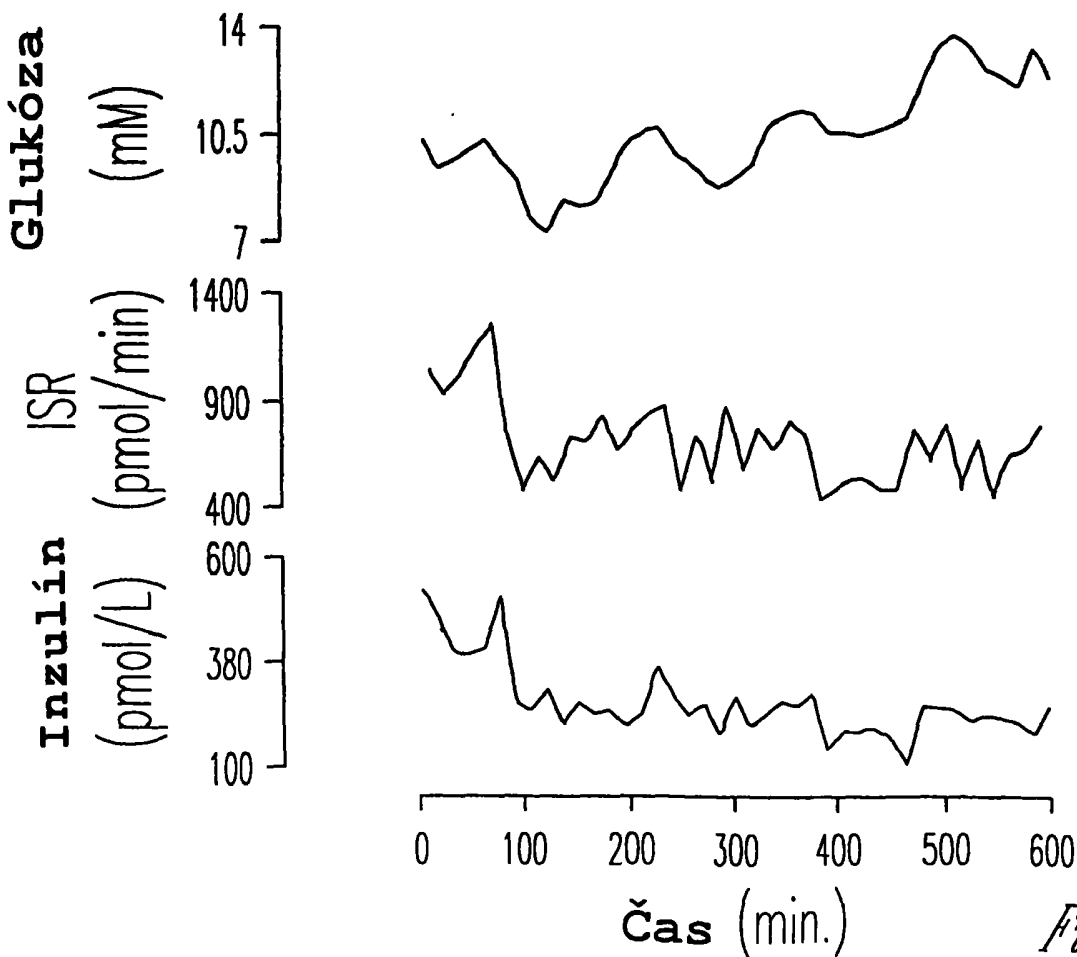


Fig. 4B

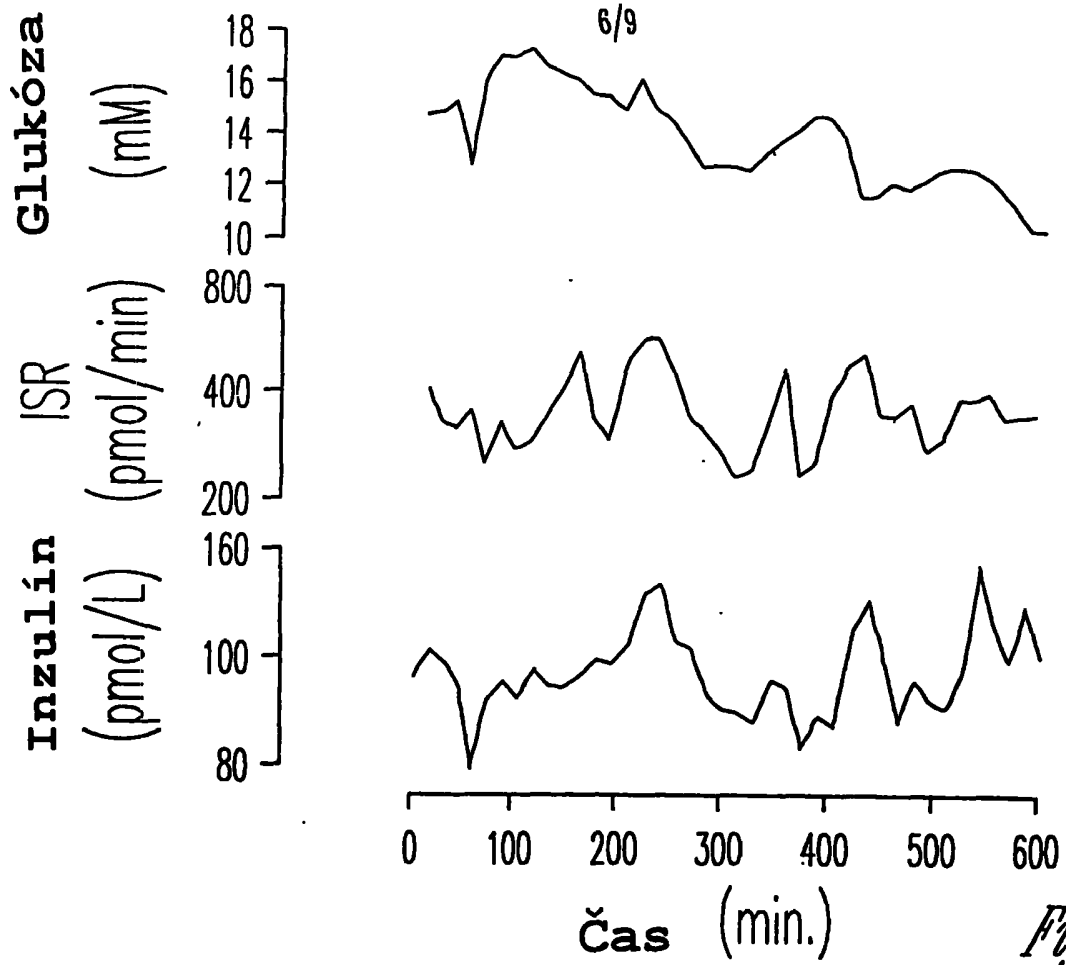


Fig. 4C

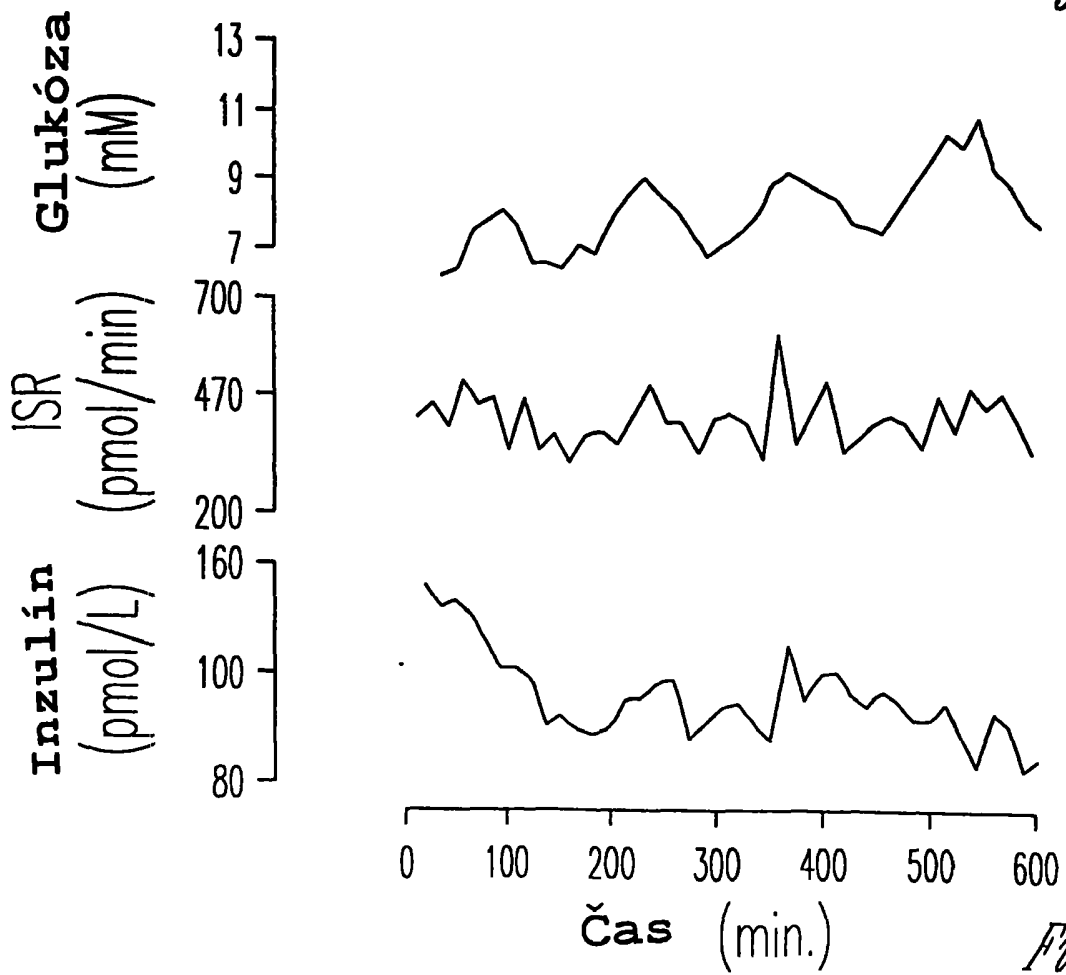


Fig. 4D

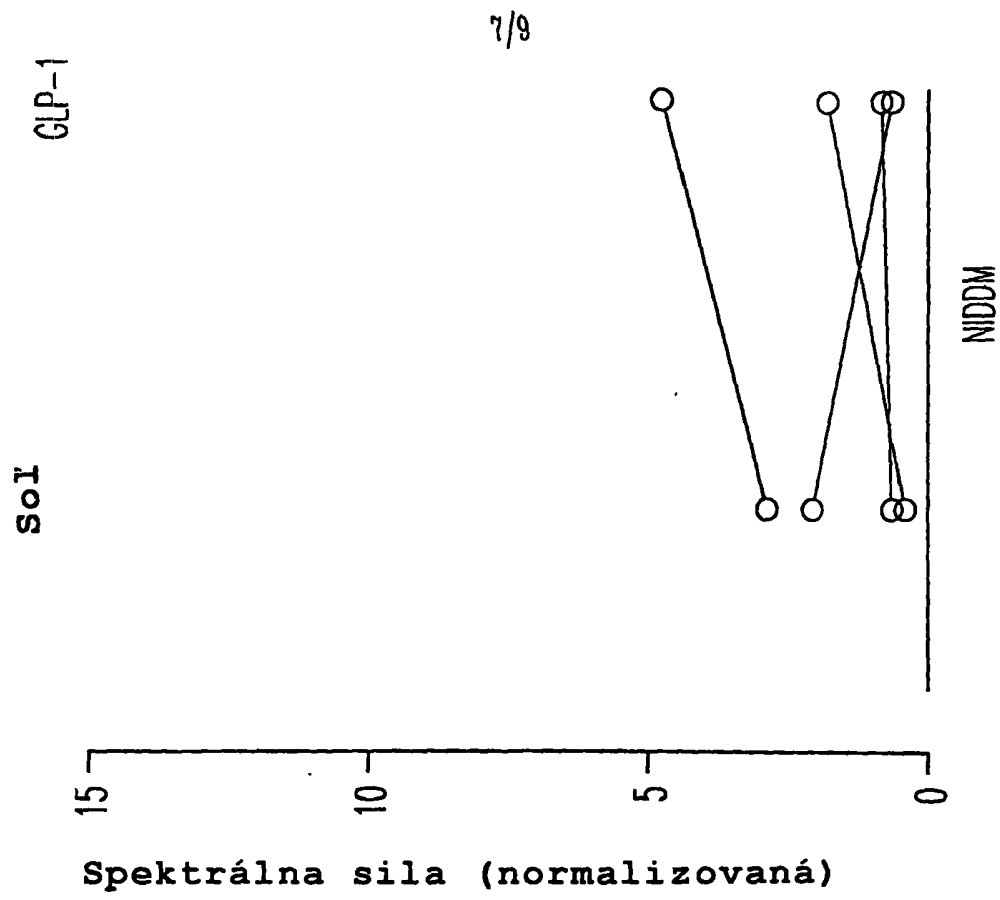


Fig. 5B

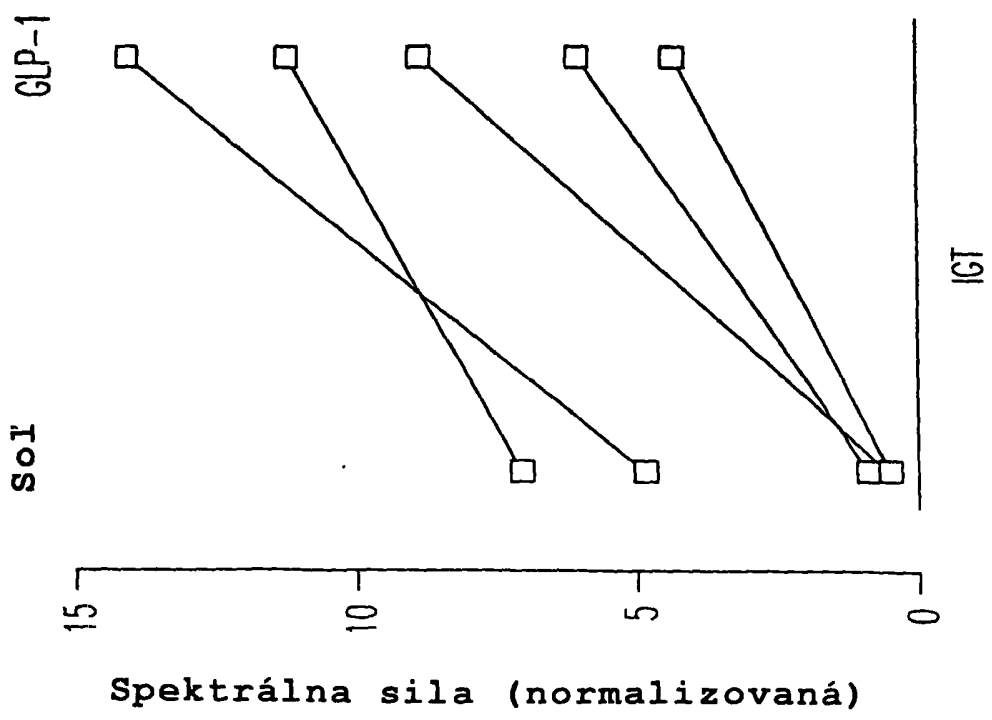
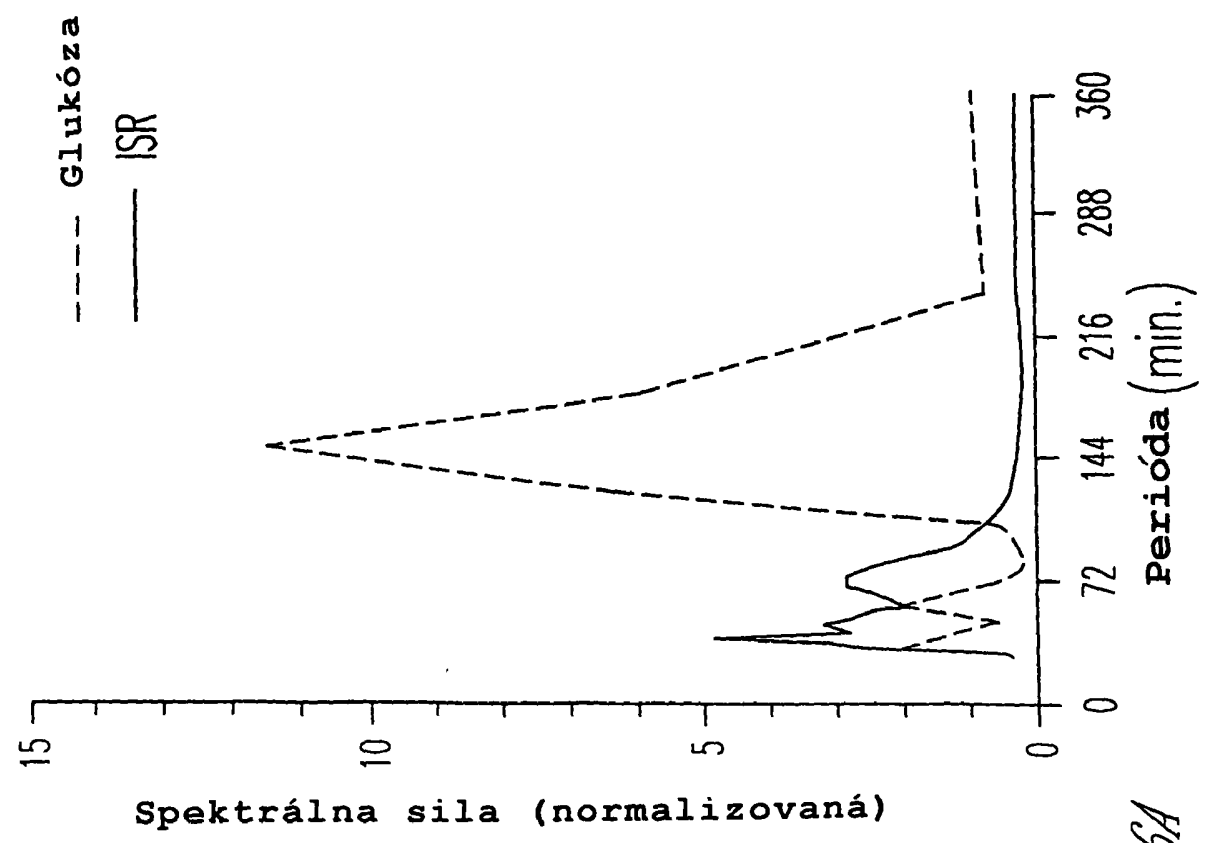
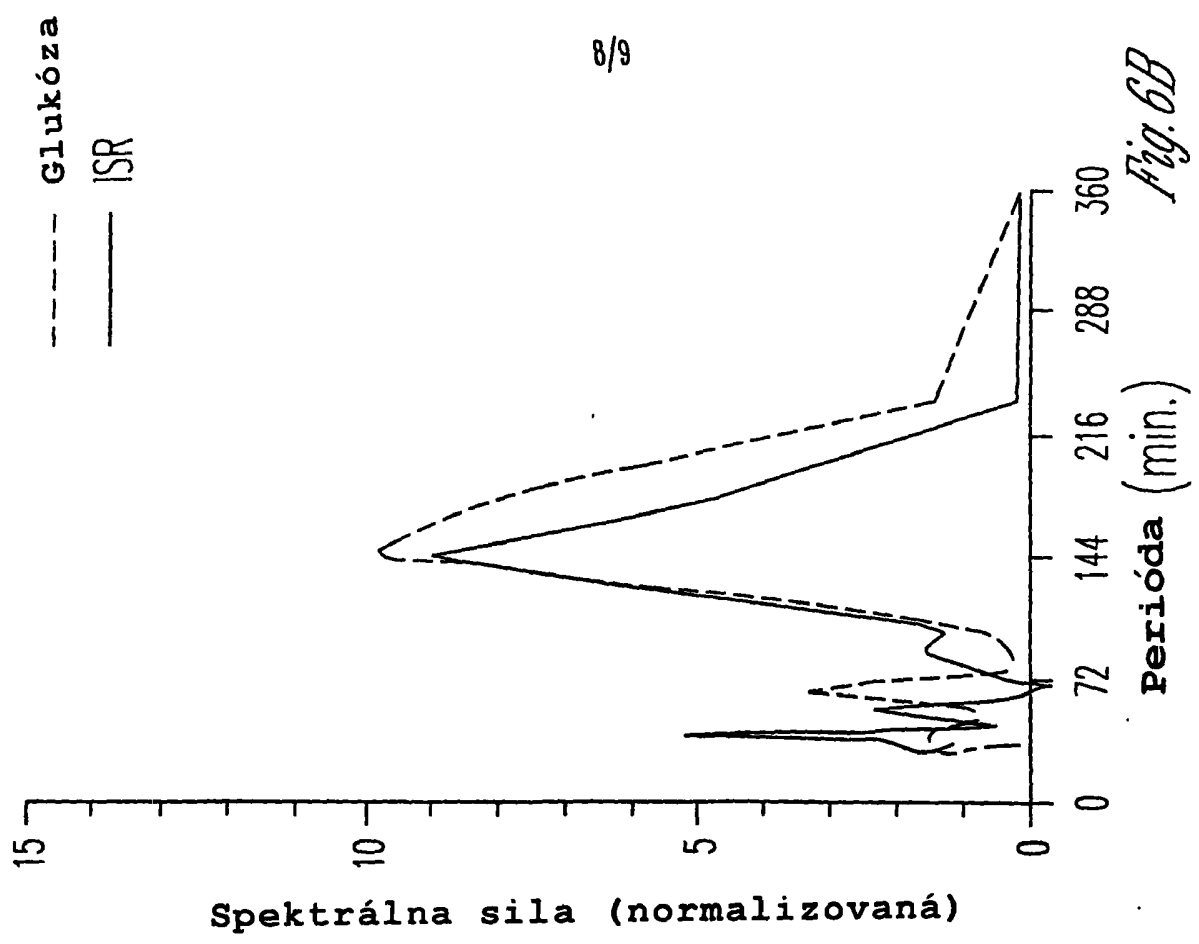


Fig. 5A



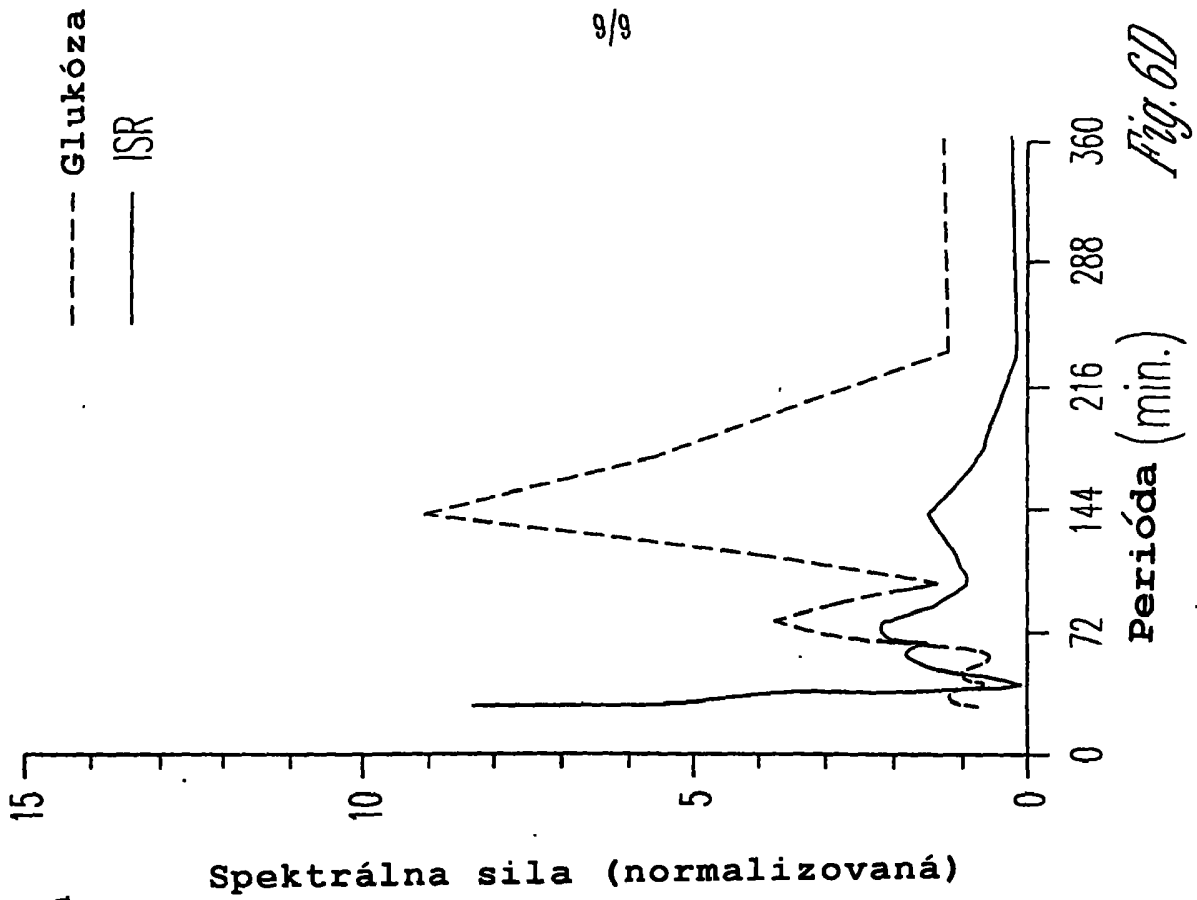


Fig. 6D

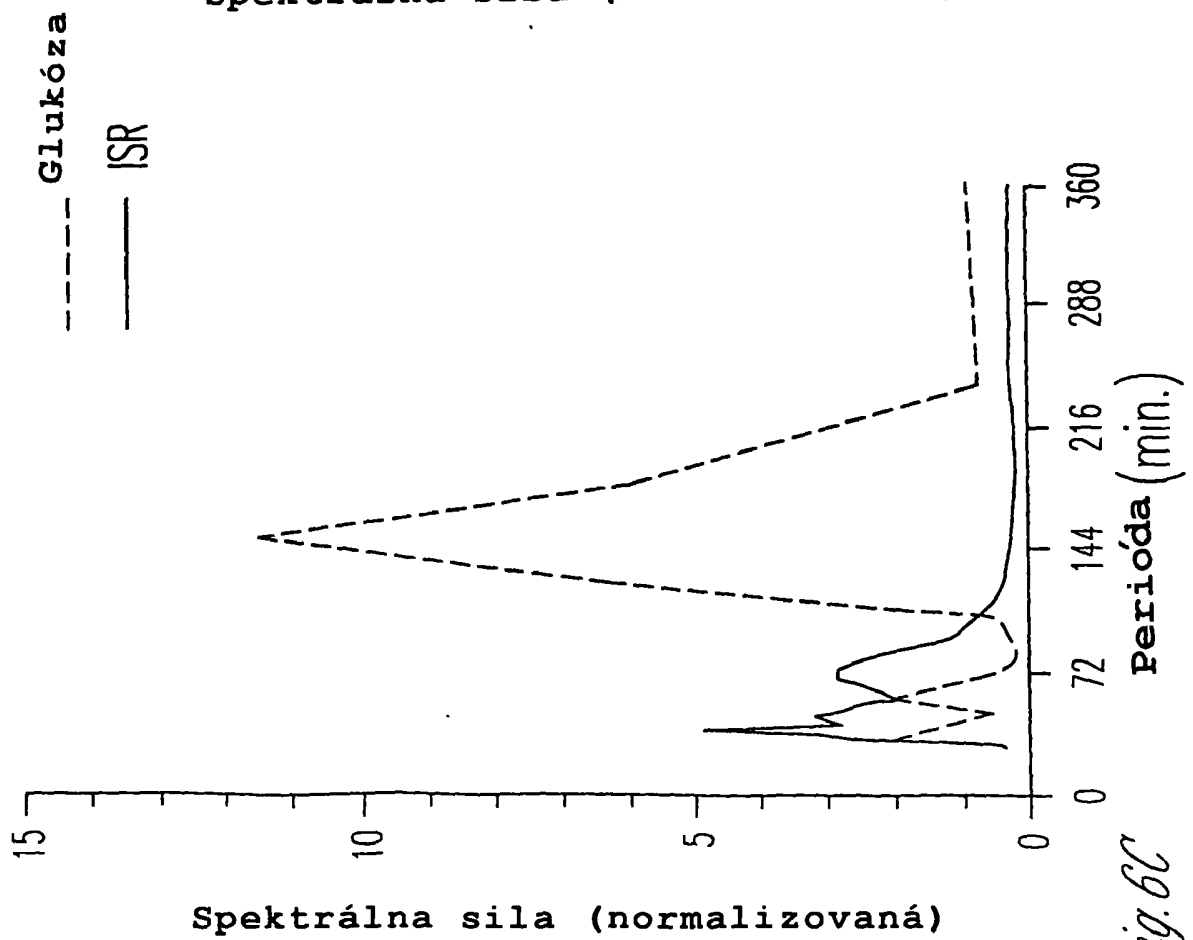


Fig. 6C