

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) **BG**

(11) **64975 B1**

(51) Int.Cl.

A 61 K 38/26 (2006.01)

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 105079
(22) Заявено на 21.12.2000
(24) Начало на действие
на патента от: 07.05.1999

Приоритетни данни

(31) 60/089,044 (32) 12.06.1998 (33) US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 9 на 28.09.2001
(45) Отпечатано на 30.11.2006
(46) Публикувано в бюлетин № 11
на 30.11.2006
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприетжател(и):
AMYLIN PHARMACEUTICALS, INC.,
92121 SAN DIEGO, 9373 TOWNE CENTRE
DRIVE, CALIFORNIA (US)

(72) Изобретател(и):
Burkhard Goke
Marburg (DE)
Maria Byrne
Lincoln, Nevada (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Фани Владимирова Божинова,
1000 София, п. к. 728

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/US1999/010040, 07.05.1999

(87) № и дата на PCT публикация:
WO1999/064061, 16.12.1999

**(54) ЕКЗЕНДИН И ЕКЗЕНДИНОВИ АНАЛОЗИ ЗА УСЪВЪРШЕНСТВАНЕ НА БЕТА-КЛЕТЪЧ-
НИЯ ОТГОВОР СПРЯМО ГЛЮКОЗА В СУБЕКТ С УВРЕДЕН ГЛЮКОЗЕН ТОЛЕРАНС**

(57) Изобретението се отнася до състав за лечение на увреден глюкозен толеранс (IGT), включващ съединение, което се свързва към рецептор за глюкагоноподобен пептид-1, и фармацевтичен носител. Количеството на присъстващото съединение е ефективно за усъвършенстване на панкреатичната β -клетъчна чувствителност за нивата на кръвна глюкоза при хора с IGT. Изобретението се отнася и до метод за подобряване образците на инсулинови секреторни отговори при хора с IGT чрез прилагане на състав, включващ съединение, което се свързва към рецептор за глюкагоноподобен пептид-1 и фармацевтичен носител.

10 претенции, 6 фигури

BG 64975 B1

(54) ЕКЗЕНДИН И ЕКЗЕНДИНОВИ АНАЛОЗИ ЗА УСЪВЪРШЕНСТВАНЕ НА БЕТА-КЛЕТЪЧНИЯ ОТГОВОР СПРЯМО ГЛЮКОЗА В СУБЕКТ С УВРЕДЕН ГЛЮКОЗЕН ТОЛЕРАНС

Област на техниката

Изобретението се отнася до екзендин и екзендинови аналози, които намират приложение за лечение на увреден глюкозен толеранс.

Предшестващо състояние на техниката

Увреденият глюкозен толеранс (IGT), по данни за населението на САЩ, се повишава от 11% при хора на възраст 20-74 години до 24%, в такива на възраст 40-75 години със семейна история на диабет и телесно тегло, по-голямо от 120% от нормалното. Субекти с увреден глюкозен толеранс са с повишен риск за развитие на кардиоваскуларна болест, а така също и неинсулин зависим захарен диабет (NIDDM), известен също като диабет тип 2.

Увреденият глюкозен толеранс се характеризира с ранни неуловими дефекти в панкреатична бета-клетъчна функция, съпътствано от инсулинова резистентност. Тези ранни дефекти включват увредена способност на бета-клетката да усеща и отговаря на малки изменения в концентрацията на глюкоза в плазмата с подходящи нива на инсулинова секреция, и леко придвижване надясно в кривата на глюкозната инсулинова секреция. Способностите на бета-клетките да отговарят чрез изпращане и бърза инсулинова секреция, са изгубени твърде рано при увреден глюкозен толеранс, когато 2-часови глюкозни нива са минимално повишени. Влошаването на глюкозния контрол в IGT с времето се дължи предимно на прогресивното увреждане на бета-клетъчното функциониране. Това води, в много случаи, до неблагоприятни състояния на хиперинсулинемия, затлъстяване, и кардиоваскуларни заболявания, понякога известни като Синдром Х. В много случаи състоянията на IGT водят до дефинитивна загуба на глюкозен контрол и унищожителното начало на неинсулин зависим захарен диабет (NIDDM).

Както е означено, състоянието на IGT води до сериозни здравни рискове. Пациентът с IGT често е със затлъстяване и има високи нива на

инсулин в плазмата, които често са токсични. Тези високи инсулинови нива произтичат главно от постоянно повишаващата се неспособност на мускулите, други тъкани и мастни клетки да усвояват инсулина да повлияе възприемането на глюкозата от кръвната плазма. IGT състоянието предразполага към повишен риск за пълния обхват кардиоваскуларни заболявания.

Глюкагоно-подобен пептид-1 (GLP-1), природен пептид, се секретира от L-клетки на червото, и действа като интрахормон, стимулиращ панкреатичните бета-клетки да секретират инсулин по глюкозозависим начин. Неговият терапевтичен потенциал в NIDDM е показан по-рано, като екзогенната инфузия на фармакологични дози от GLP-1 общо редуцира нивата на плазмената глюкоза. Обаче, GLP-1 не повишава значително бета-клетъчната функция в NIDDM. Nathan DM, Schreiber E., Fogel H., Mojsov S, Habener JF, Insulinotropic action of glucagon-like peptide-1 (7-37) в здрави и болни от диабет субекти. *Diabetes Care* 15: 270-276, 1992; Gutniak M, Orskov C, Hoist JJ, Ahren B, Efendric S., Антидиабетогенните ефекти на глюкагоно-подобен пептид-1 (7-36) амид у нормални субекти и пациенти със захарен диабет, *N Engl J. Med* 326:1316-1322, 1992; Nauck MA, Kleinle N. Orskov C, Hoist JJ, Willms B, Creutzfeldt W. Normalization of fasting hyperglycemia by exogenous glucagons-like peptide-1 (7-36 amide) in type II (non-insulin-dependant) diabetic patients. *Diabetologia* 36: 741-744, 1993; Gutniak MK, Linde B, Hoist JJ, Efendie S. Subcutaneous injection of the incretin hormone glucagons-like peptide-1 abolishes postprandial glycaemia 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 glucagons-like peptide-1 (7-36) amide in patients with NIDDM. *Diabetes* 45: 1524-1530, 1996; Rachman J, Barrow BA, Lavy JC, Turner RC. Near normalization of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagons-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM, *Diabetologia* 40: 205-211, 1997.

IGT състоянието понастоящем не може да бъде лекувано. Това, обаче е състояние на заболяване, което може да бъде разпознато и което се асоциира със сериозни здравни рискове.

Най-общо, IGT състоянието води до прогресивно влошаване по отношение на симптомите и често води до загуба на плазмен глюкозен контрол, който определя диабет тип 2. Тогава се явява необходимост от лечение.

Множество изследвания през последните няколко години показват, че прилагането на GLP-1 в случаите на NIDDM понижава глюкозните и инсулинови нива в кръвта, поради което представляват обещаваща терапия за това заболяване. Обаче, няма изследвания понастоящем, показващи че GLP-1 притежават потенциал да коригират загуба на способността на бета-клетките смислено и бързо да отговорят със секретирание на инсулин при повишаване на кръвната глюкоза. Това е такова влошаване на способността да отговори и да доближи усещането за повишаване нивото на кръвна глюкоза до инсулиновата секреция от бета-клетките, което по принцип причинява IGT състоянието. В предходни изследвания прилагането на GLP-1 към NIDDM субекти демонстрира способност да нормализира стабилната плазмена глюкоза и да стабилизира и да стимулира кумулативната бета-клетъчна инсулинова секреция. Обаче, GLP-1, инфузирани за една нощ в NIDDM субекти, не подобряват глюкозните отговори спрямо храненията следващия ден. Когато GLP-1 е инфузиран за 19 h, една нощ и по време на три стандартни хранения в субекти с NIDDM, нивата на плазмената глюкоза са редуцирани, но увредената постпрандиална бета-клетъчна функция е само слабо подобрена.

Бета-клетъчни отговори за пролонгирана инфузия на GLP-1 не са изследвани по-рано в субекти с IGT и, доколкото няма индикация, че резултатът би бил различен в сравнение с GLP-1 инфузии в NIDDMs, подробни изследвания на ефекта на GLP-1 върху бета-клетъчните отговори при малки повишения и понижения в концентрацията на плазмена глюкоза, не са представени.

Съответно, необходим е метод за спиране развитието на IGT и възстановяване на нормалния глюкозен метаболизъм.

Техническа същност на изобретението

Задача на настоящото изобретение е да се предложи метод за възстановяване или подоб-

ряване на бета-клетъчната функция и чувствителност, и по този начин и образците на инсулинова секреция, в отговор на нивата на глюкоза в гостоприемник, притежаващ увреден глюкозен толеранс.

Друг обект на настоящото изобретение е да се предложи метод за отлагане или предотвратяване влошаването на бета-клетъчната функция, която е отговорна за прогресиране на увреден глюкозен толеранс при загубата на контрол върху плазмена глюкоза, характеризиращо се с начало на NIDDM.

Друг следващ обект на изобретението е подобряване на ефектите на IGT върху кардиоваскуларни заболявания, като по този начин се понижават рисковете от кардиоваскуларни заболявания и удар.

Методът за осъществяване на тези и други обекти ще станат видни от следващото подробно описание.

Открито е, че прилагането на GLP-1 на субекти с увреден глюкозен толеранс пренастройва тясно координирания отговор на инсулинова секреция спрямо повишения в нивата на плазмена глюкоза, възстановявайки по този начин образците на инсулиново секретционния отговор от бета-клетките спрямо повишенията на нивата на плазмена глюкоза, които са характерни за нормалните субекти без IGT.

Така, настоящото изобретение е насочено към метод за лечение на гостоприемник с увреден глюкозен толеранс и инсулинова резистентност с GLP-1 в количество, ефективно да възстанови, подобри или нормализира бета-клетъчната чувствителност и функция и образците на инсулинова секреция в този гостоприемник. Изобретението е насочено още и към метод за редуциране нивото на плазмения инсулин у лица с IGT и конкурентно редуциращ състоянието на инсулинова резистентност и съпътстващото кардиоваскуларно заболяване.

При провеждане на описаните по-долу примери, изненадващо е установено, че прилагането на GLP-1 на субекти с IGT, в противоположност на случаен и некоординиран инсулинов отговор характерно проявен в IGT субекти, драматично възстановяват чувствителна, бърза и координирана секреция от бета-клетките в отговор на дискретни пулсативни повишения на плазмена глюкоза, сходни на образците на инсулинова

секреция, установени у нормални пациенти.

Описание на фигурите

Фигура 1 показва глюкозния, инсулинов и GLP-1 отговори на орално приложени 75 mg глюкоза у пет субекта с увреден глюкозен толеранс (IGT) и пет субекта с неинсулин зависим захарен диабет (NIDDM). Фигура 1A показва средния глюкозен отговор. Фигура 1B показва инсулинов отговор. Фигура 1C показва GLP-1 отговор;

Фигура 2 предлага сравнение на средните стойности на инсулинова секреция (ISR) и средните глюкозни концентрации във всеки субект по време на глюкозната инфузия с инфузия със соли (O) или GLP-1 инфузия (*). Фигура 2A показва сравнението на субекти с IGT. Фигура 2B показва сравнението на субекти с NIDDM;

Фигура 3 предлага глюкозните профили, степените на инсулинова секреция (ISR) и инсулинови концентрации в два субекта с IGT, субекти D01 и D02. Фигури 3A и 3C показват отговорите на инфузия със соли. Фигури 3B и 3D показват отговорите спрямо GLP-1 инфузия;

Фигура 4 предлага сравнение на глюкозните нива, стойностите на инсулинова секреция (ISR) и инсулинови нива на два субекта с NIDDM, субекти D07 и D09. Фигури 4A и 4C показват профилите по време на инфузия със соли. Фигури 4B и 4D показват профилите по време на GLP-1 инфузия;

Фигура 5 показва сравнение на спектралните анализи на инсулинова секреция у субекти по време на инфузия с GLP-1 и соли. Резултатите, показани на лявата страна на спектралния анализ са субекти с IGT. Резултатите, показани отясно на спектралния анализ са на субекти с NIDDM;

Фигура 6 осигурява сравнение на нормализирана спектрална сила по време на инфузия на физиологичен разтвор и по време на инфузия на DLP-1. Фигури 6A и 6B показват сравнение на нормализирана спектрална сила по време на инфузия на физиологичен разтвор (6A) и инфузия на DLP-1 (6B) в обект с IGT (D02). Фигури 6C и 6D показват сравнение на нормализирана спектрална сила по време на инфузия на физиологичен разтвор (6C) и инфузия на DLP-1 (6D) в обект с NIDDM (D07).

Подробно описание на изобретението

Установено е, че въвеждането на GLP-1 в субекти с увреден глюкозен толеранс (IGT) възстановява или подобрява панкреатичната бета-клетъчна функция и способността на бета-клетките да отговарят бързо със секретирание на инсулин по координиран начин в отговор на слаби повишения или изменения в плазмените глюкозни концентрации, например пулсатилни секретиции на инсулин, сходни на образците на инсулинова секреция, установени в субекти без IGT. Този образец на инсулинова секреция не се възстановява в субекти, които имат вече развит NIDDM, който се характеризира със загуба на плазмен глюкозен контрол.

Бета-клетъчната функция се определя чрез нормализирана спектрална сила. Спектрална сила измерва бета-клетъчна функция, която не зависи от установяване на инсулинова чувствителност. В субекти с IGT, GLP-1 се подобрява спектралната сила в нормален обхват. Профилите на спектрална сила означават, че натоварването или близката координация на плазмена глюкоза и колебанието на инсулиновата секреция се възстановяват до нормални нива в субекти с IGT след въвеждане на GLP-1. Това подобрене на образците на колебания на инсулинова секреция е важно за поддържане на нормалния глюкозен хомеостазис. Например, показано е, че инсулинови инфузии, които имитират свръхколебанията в рамките на период от 120 min, са по-ефективни в сравнение с постоянните инфузии на инсулин в редуцирането на плазмените глюкозни концентрации (27).

Настоящото изобретение предлага състав, включващ съединение, което се свързва към рецептор за глюкагоноподобен пептид-1 и е ефективно за подобряване способността на бета-клетките да усещат и отговарят на малки изменения в плазмените глюкозни концентрации в субекти с IGT. В един вариант на изпълнение, свързващото рецептора съединение е глюкагоноподобен пептид-1. В друг вариант на изпълнение, свързващото рецептора съединение е вариантен пептид, в който комбинацията от замествания, делеции и варианти не се отличават по повече от десет аминокиселини от глю-

кагоноподобен пептид-1. Рецептор-свързващото съединение може по-нататък да включва полинуклеотид или агент, който активира освобождаването на GLP-1, молекула, която активира GLP-1 рецептора, или GLP-1 рецептор свързващо съединение, което включва химично структурирана молекула, пептидни аналози или агонисти на GLP-1.

Открито е, че прилагането на човешки GLP-1 засилват или възстановяват натоварване на инсулинови секреторни отговори спрямо малки промени или повишения на плазмена глюкоза. Съответно, съставът съгласно изобретението е приложим за терапевтично третиране на нормализиращ подобрен глюкозен толеранс.

Инфузия с ниска доза GLP-1 може да подобри функцията на бета-клетките да секретират инсулин в отговор на повишения на плазмените глюкозни нива. Така, GLP-1 може също да бъде използван, за да подобри съхраняването на бета-клетъчната функция в субекти с IGT. Прилагането на GLP-1 също регулира или нормализира образците на инсулиновата секреция, което ще доведе до общо редуциране на плазменния инсулин в IGT. Това нормализиране на свой ред ще редуцира състоянието на инсулинова резистентност.

Терминът "GLP-1", или глюкагоноподобен пептид, включва GLP-1 миметици, и както се използва в контекста на настоящето изобретение, може да бъде обхванат от глюкагоноподобни и сродни пептиди и аналози на глюкагоноподобен пептид-1, който свързва към глюкагоноподобен пептид-1 (GLP-1) рецепторен протеин като GLP-1 (7-36) амиден рецепторния протеин и притежава съответен биологичен ефект върху инсулиновата секреция като GLP-1 (7-36) амид, който е нативна, биологично активна форма на GLP-1, See Goke, B and Byrne, M, *Diabetic Medicine*, 1996, 13: 854-860. GLP-1 рецепторите са клетъчно-повърхностни протеини, установени например, върху инсулин-продуциращи панкреатични бета-клетки. Глюкагоноподобни пептиди и аналози ще включват видове, притежаващи инсулинотропична активност и които са агонисти на, напр. активиращата GLP-1 рецепторна молекула и нейната втора месенджерна активност върху, *inter alia*, инсулин продуциращи бета-клетки. Описани са агонисти на глюкагоноподобен пептид, които проявяват активност посред-

ством този рецептор: EP 0708179A2; Hjorth, S.A. et al., *J. Biol. Chem.* 269 (48): 30121- 30124 (1994); Siegel, E.G. et al. *Amer. Diabetes Assoc. 57th Scientific Sessions*, Boston (1997); Hareter, A. 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 Federation Congress Abstracts, Diabetologia Supplement* (1997); Irwin, D.M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:7915-7920 (1997); Mosjov, S. *Int. J. Peptide Protein Res.* 40: 333-343 (1992). Глюкагоноподобни молекули включват полинуклеотиди, които експресират агонисти на GLP-1, напр. активатори на GLP-1 рецепторна молекула и нейната вторична информационна активност, установена върху, *inter alia*, инсулин-продуциращи бета-клетки. GLP-1 миметици, които са също агонисти на бета-клетки, включват, например, химични съединения, специфично конструирани да активират GLP-1 рецептора. Глюкагоноподобни пептид-1 антагонисти също са известни, например виж Watanabe, Y. et al., *J. Endocrinol.* 140(1): 45- 52 (1994), и включват екзедин (9-39) амин, екзединов аналог, който е потенциален антагонист на GLP-1 рецептори (виж, напр. WO 1997/046584). Последните публикации описват Black Window GLP-1 Ser² GLP-1, see G.G. Holz, J.F. Hanker/*Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 121 (1998) 177-184 and Ritzel, et al., A synthetic glucagons-like peptide-1 analog with improved plasma stability, *J. Endocrinol.* 1998 Oct.; 159(1): 93-102.

По-нататъшни варианти включват химично синтезирани глюкагоноподобни полипептиди, както и каквито и да са полипептиди или техни фрагменти, които са по същество хомолози. "По същество хомолози", които може да се отнасят както до нуклеиново киселинни, така и до аминокиселинни последователности, означава, че определена последователност, например мутантна последователност, се различава от референтна последователност по едно или повече замествания, делеции или добавки, нетният ефект от които не води до неблагоприятно функционално несходство между последователностите на обекта и на референта. За целите на настоящото изобретение, последователности, притежаващи по-голяма от 50% хомоложност, и за предпочитане повече от 90% хомоложност, ек-

вивалентна биологична активност при повишава-
не на бета-клетъчните отговори на плазмени глю-
козни нива, като еквивалентните експресионни ха-
рактеристики са считани за по същество
хомоложни. За целите на детерминиращата
хомоложност, срязването на зрялата последова-
телност следва да бъде елиминирано. Последователности, притежаващи по-малки сте-
пени на хомоложност, сравнителна биологична
активност и еквивалентни експресионни
характеристики, са считани за еквиваленти.

GLP пептиди от бозайник и глюкагон са ко-
дирани от един и същ ген. В илеума фенотипът
се изразява в два големи класа GLP пептидни
хормони, наречени GLP-1 и GLP-2. Известни са
четири сродни GLP-1, които са образувани от фе-
нотипичните пептиди. GLP-1 (1-37) има после-
дователността

His Asp 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) се амидира чрез посттранс-
лациона обработка за получаване на GLP-1 (1-
36) NH₂, който притежава последователността

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

или ензимно обработен до получаване на
GLP-1 (7-37), който притежава последовател-
ността

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Ser Asp Val
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) може също да бъде амиди-
ран за получаване на GLP-1 (7-36) амид, който е

природната форма на GLP-1 молекула и който
има последователността

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) и в природната форма на GLP-1
молекулата.

Интестиналните L клетки секретират GLP-1
(7-37) (SEQ ID NO: 3) и GLP-1 (7-36) NH₂ (SEQ
ID NO: 4) в съотношение 1 до 5, съответно. Тези
срязани форми на GLP-1 имат кратка степен на
полуживот *in situ*, т.е. по-малко от 10 min и се
инактивират с аминокдипептидаза IV за получа-
ване на

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);

и

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),
съответно.

Пептидите 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)

и

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),

се предполага, че предизвикват продуци-
рането на чернодробна глюкоза, но не стимули-
рат продуцирането или освобождаването на ин-
сулин от панкреаса.

Има шест пептида в *Gila monster venoms*,
които са хомоложни на GLP-1. Техните после-
дователности са сравнени с последователнос-
тите на GLP-1 в таблица 1.

ТАБЛИЦА 1

a. HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRNH₂

b. HSDGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPS
SGAPPPSNH₂

c. DLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSSGAPPPS
NH₂

d. HGEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPS
SGAPPPSNH₂

e. HSDATFTA EYSKLLAKLALQKYLE SILGSSTSP
RPPSS

f. HSDATFTA EYSKLLALQKYLE SILGSSTSPRPPS

g. HSDAIFTEEYSKLLAKLALQKYLASYLGSRTSP
PPNH₂

h. HSDAIFTQQYSKLLAKLALQKYLASILGSRTSP
PPNH₂

a= GLP-1 (SEQ ID NO:4).

b= Exedin 3 (SEQ ID NO:7)

c= Exedin 4 (9-39 (NH₂)(SEQ ID NO:8).

d= Exedin 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)

Най-голяма хомоложност, както е означено с подчертаните области на таблица 1 е: пептиди с и h са производни от d и g, съответно. Всичките 6 природно срещани пептиди (a, b, d, e, f и g) са хомоложни в позиции 1, 7 и 18. GLP-1 и екзендини 3 и 4 (a, b и d) са по-нататък хомолози в позиции 4, 5, 6, 8, 9, 15, 22, 23, 25, 26 и 29. В позиция 2, A, S и G са структурно сходни. В позиция 3 остатъците D и E (Asp и Glu) са структурно сходни. В позиции 22 и 23 F (Phe) и I (Ile) са структурно сходни на Y (Tyr) и L (Leu), съответно. Вероятно, в позиция 26 L и I са структурни еквиваленти.

Така, 30-те остатъка на GLP-1, екзендини 3 и 4 са идентични в позиции 15 и еквивалентни в 5 допълнителни позиции. Единствените позиции, където са видни радикални структурни изменения, са 16, 17, 19, 21, 24, 27, 28 и 30. Екзендините също имат 9 екстра остатъка в карбоксилния край.

Подобни на GLP-1 пептиди може да бъдат създадени чрез твърдофазен химичен пептиден синтез. GLP-1 може още да бъде получен чрез конвенционални рекомбинантни техники с помощта на стандартни процедури, описани например в Sambrook and Maniatis. "Рекомбинантен", както се използва тук, означава че протеинът е получен от рекомбинантни (например, микробиална или бозайникова) експресионни системи, които са генетично модифицирани да съдържат ген на експресия за GLP-1 или неговите биологично активни аналози.

GLP-1 подобните пептиди могат да бъдат възстановени и пречистени от рекомбинантни клетъчни култури по методи, включващи, но без да се ограничават до, утаяване с амониев сулфат или етанол, кисела екстракция, анион или катионообменна хроматография, фосфоцелуозна хроматография, хидрофобна хроматография, афинитетна хроматография, хидроксилапатитна хроматография и лектинова хроматография. Високо скоростна течна хроматография (HPLC) може да бъде използвана за крайните етапи на пречистване.

Полипептидите от настоящото изобретение могат да бъдат естествено пречистени продукти, или продукти на химични синтетични процедури, или получени чрез рекомбинантни техники от прокариотични или еукариотични гостоприемници (например чрез бактерии, дрожди,

висши растения, насекоми и клетки на бозайници в култура или *in vivo*). В зависимост от използвания гостоприемник в една рекомбинантна процедура за получаване на продукт, полипептидите от настоящото изобретение са обикновено негликозилирани, но могат да бъдат и гликозилирани.

GLP-1 активността може да бъде определена по стандартни методи, най-общо, чрез рецептор-свързващи активността скринингови процедури, които включват осигуряване на подходящи клетки, които експресират GLP-1 рецептора на повърхността им, например, инсулиномни клетъчни линии като RINmSF или INS-1 клетки. Виж също Mosjov, S.(1992) и EP 0708170 A2. В допълнение, за измерване на специфичното свързване на трейсер към мембрана с помощта на радиоимунологични методи, cAMP активността или зависимо от глюкозата продуциране на инсулин също може да бъде измерено. В един метод, полинуклеотидното кодиране на рецептора от настоящото изобретение се използва за трансфектиране на клетки за експресия на GLP-1 рецепторния протеин. Така например, тези методи могат да бъдат използвани за скрининг за рецепторен агонист чрез контактуване на такива клетки със съединения, които следва да бъдат скринирани и определяне дали такива съединения генерират сигнал, т.е. да активират рецептора.

Поликлонални и моноклонални антитела могат да бъдат използвани за определяне чистотата и идентичността на GLP-1 подобни пептиди за приложение в методите, описани тук. Антитела като ABGA1178 определят интактен неразцепен GLP-1 (1-37) или N-терминално срян GLP-1 (7-37) или (7-36) амид. Други антитела установяват в самия край на C-края от прекурсорната молекула, процедура, която позволява чрез изваждане да се изчисли количеството на биологично активния срян пептид, т.е. GLP-1 (7-37) или (7-36) амид (Orskov et al. Diabetes, 1993, 42: 659- 661; Orskov et al. J. Clin. Invest. 1991, 87:415-423).

Други скринингови процедури включват използването на клетки, които експресират GLP-1 рецептора, например, трансфектирани CHO клетки, в система, която измерва екстрацелуларно pH или йонни промени, причинени от рецепторно активиране. Например, потенциални аго-

нисти могат да влязат в контакт с клетки, които експресират GLP-1 протеиновия рецептор и втори информационен отговор, напр. сигнална трансдукция или йонни или pH промени, могат да бъдат измерени за определяне на това дали потенциалният агонист е ефективен.

Глюкагоноподобните пептид-1 рецептор свързващи протеини от настоящото изобретение могат да бъдат използвани в комбинация с подходящ фармацевтичен носител. Такива състави включват терапевтично ефективно количество от полипептида и фармацевтично приемлив носител или ексципиент. Такъв носител включва, без да се ограничава до, сол, буферна сол, декстроза, вода, глицерол, етанол, лактоза, фосфат, манитол, аргинин, трехалоза и комбинация от тях. Формите следва да пасват на начина на приложение и се установяват от специалиста в областта. GLP-1 пептидът може да бъде използван също в комбинация с агенти, известни в областта, които удължават полуживота *in vivo* на пептида с оглед повишаване или пролонгиране биологичната активност на пептида. Например, молекулата или химично количество от нея могат да бъдат ковалентно свързани към състава от настоящото изобретение преди приложението им. Обратно, подсилващият агент може да бъде прилаган конкурентно със състава. Още повече, агентът може да включва молекула, която е известно, че инхибира ензимното разграждане на GLP-1 подобни пептиди и може да бъде прилаган конкурентно със или след прилагане на GLP-1 пептидния състав. Такава молекула може да бъде прилагана, например, орално или инжекционно.

GLP-1 може да бъде прилаган интравенозно или субкутанно, и може да бъде прилаган непрекъснато или болус инжекционно. Тотално приложение може да се осъществи заедно с, преди или след инжектиране или инфузия на глюкоза. Могат да бъдат използвани следните дози: За непрекъснатата инфузия интравенозно (I.V.) 0.1 pmol/kg/min до 10 pmol/kg/min и субкутанно (S.C.) 0.1 1 pmol/kg/min

до 75 1 pmol/kg/min и за еднократно инжектиране (болус) I.V. 0.005 nmol/kg до 20 nmol/kg S.C. 0.1 nmol/kg до 100 nmol/kg.

Предпочитаният метод на приложение на GLP-1 пептида е чрез непрекъснато прилагане. Обаче, GLP-1 може да бъде доставен субкутанно, интрамускулно, интраперитонеално, инжекционно депо с поддържано освобождаване, вдихване в белите дробове с поддържано освобождаване както интравенозно, букално, прекъснато или по който и да е друг метод за доставяне до целта.

Ефективното лечение на IGT също понижава риска от кардиоваскуларни и цереброваскуларни събития. Поради това то може да бъде предложено като превантивно за пациенти, за които се знае, че са с висок риск от такива събития.

Следващите примери илюстрират настоящото изобретение, без да ограничават неговия обхват.

Примери за изпълнение на изобретението

Изследванията, описани тук са проведени в 10 субекта, които са разделени на две групи на базата на техния плазмен глюкозен отговор спрямо един орален тест на глюкозния толеранс с помощта на критерия на Световната Здравна Организация (21) за дефиниране степента на глюкозен толеранс. Пет субекта имат IGT, и пет субекта имат NIDDM. Полът, възрастта, индексът на телесната маса (ВМК), основните нива на постоянна глюкоза, 2-часова глюкоза, постоянен инсулин и HBA1c за всеки субект са представени на таблица 2. Субектите с диабет са по-възрастни от онези с IGT, но групите са маркирани с BMI. Средните нива на постоянна глюкоза и концентрациите на гликозилиран хемоглобин са по-ниски в IGT групата в сравнение със субекти с NIDDM. Нивата на постоянния инсулин не се отличават между групите.

Таблица 2

Основни клинични параметри на субекти с IGT и NIDDM

ID	пол	възраст	BMI	Постоянна глюкоза (nM)	2 hr глюкоза (mM)	Постоянен инсулин (pmol/L)	Глико- хемоглобин
IGT							
D01	M	50	25.7	5.78	8.99	54.84	5.8
D02	F	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
средно±SE		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
средно±SE		58.6±2.5	28.1±1.7	7.71±0.39	14.83±1.29	44.5±10.0	7.12±0.39
P стойност		P<0.009	P=0.36	P<0.002	P<0.007	P=0.15	P<0.004

Нивата на плазмена глюкоза са измерени чрез глюкозооксидазна техника (YSI, 1500 G, Shlag Company, Bergisch-Gladbach, Germany). Коефициентът на вариация по този метод е <2%. Плазменият инсулин се измерва чрез Abbott Imx Microparticle Enzyme Immunoassay. Средният коефициент на вариация в пробата е 5%. Плазменият С-пептид се измерва, както е описано по-рано в (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. Пониският лимит на чувствителност на пробата е 0.02 pmol/ml и коефициентът на вариация в пробата е средно 6%. Глюкагонът се измерва с помощта на търговско достъпен кит за радиоимунологично изпитване (Biermann, Bad Nauheim, Germany), коефициентът на вариация в пробата е

средно 8%. IR-GLP-1 се измерва с помощта на специфично поликлонално антитяло GA 1178 (Affinity Research, Nottingham, U/K)(23). То притежава 100% реактивност с GLP-1 (1-36) амид и срязаният GLP-1 (1-36) амид. Имунореактивният GLP-1 подобен материал се екстрахира от плазмени проби върху C-18 касета с помощта на ацетонитрил за елуация на пробите. Установяването на лимита на пробата е 2 fmol/tube. Антисерумът не влиза в кръстосана реакция с GIP, панкреатичен глюкагон, глицентин оксинтомодулин или GLP-2. Интра- и интер-коефициентите на вариация на пробата са 3.4% и 10.4%, съответно.

Всички резултати са изразени като средни ± SEM. (SAS Version 6 Edition, for Personal Computers, SAS Institute, Inc., Cary, NC). Значимостта на разликите между индивидите,

индуцирани от GLP-1 инфузия, се определя с помощта на двойни t тестове. Счита се, че разликите са значими, ако $P < 0.05$.

Използвани са стандартните кинетични параметри за С-пептидното пречистване според възраст, пол и телесна повърхност (24), Van Cauter E, Mestrez, F, Sturis J, Polonsky KS. Изпитване на степените на инсулинова секреция от С-пептидни нива: сравняване на индивидуалните и стандартни кинетични параметри за С-пептидно пречистване, *Diabetes* 41: 368-377, 1992. Тези параметри са използвани за получаване, в 15-минутен интервал между взимане на кръвните проби, на ISR от плазмените С-пептидни концентрации, както е описано по-рано (25, 26).

Диабетно болните се подлагат на диета самостоятелно, с изключение на един субект D07, който по-рано е третиран орално с хипогликемичен агент, което е станало 4 седмици преди изследването. Нито един от диабетно болните не е получавал някога инсулин. Всички субекти са поставени на поддържаща теглото диета, съдържаща поне 200 g въглехидрати на ден в продължение на две седмици преди изследването.

Всеки субект се изследва при три отделни обстоятелства. Всички изследвания се провеждат след 12-часово начало през нощта при 0700 в лежача позиция. Поставя се интравено-

зен катетър във всяка предмишница, един за взимане на кръвна проба и един за въвеждане на глюкоза и GLP-1, ако е необходимо. Във всички експерименти, ръката с катетър се покрива с одеало за осигуряване артериализиране на кръвната проба. В следващите примери, GLP-1 се въвежда у субектите под формата на GLP-1 (7-36) амид.

Пример 1 (Тест на орален глюкозен толеранс)

Кръвните проби се взимат за измерване на глюкоза, С-пептид, инсулин, глюкагон и GLP-1 при 30-минутни интервали за 120 min след инжектиране на 75 g глюкоза (Boehringer, Mannheim, Mannheim, Germany). Участъците на нарастване под кривата (AUC) от 0 до 120 min се изчисляват за глюкоза, инсулин, С-пептид, глюкагон и GLP-1. Глюкозните концентрации се използват за определяне степента на глюкозна непоносимост съгласно изискването на Световната Здравна Организация. Отговорът на IGT и NIDDM групите спрямо орална глюкоза е показан на таблица 3.

Глюкозните, инсулинови и GLP-1 отговори на субектите спрямо 75 mg глюкоза са показани на фигура 1. AUC за глюкоза от 0 до 120 min са по-ниски в IGT групата, но AUC за инсулин, С-пептид, глюкагон и GLP-1 не се отличават.

ТАБЛИЦА 3
Отговор на орална глюкоза

2 h AUC	IGT n=5	NIDDM n=5
Глюкоза (mM. min/l)	1290 ± 41	1628 ± 76*
Инсулин (pmol. min/L)	53,750 ± 10,648	26.083 ± 10, 047
С- пептид (pmol. min/L)	293 ± 40	180 ± 48
Глюкагон (ng. min/L)	8130 ± 1324	6858 ± 920
GLP-1 (pmol. min/L)	805 ± 141	983 ± 111

$P < 0.05$ за IGT спрямо NIDDM

Когато средните ISR се съпоставят със средните нива на глюкоза, се наблюдава, че GLP-1 причинява значително редуциране нивата на глюкоза без значима промяна на средните стойности на инсулинова секреция (фигура 2).

Пример 2 (Прилагане на инфузия с колебателна глюкозна)

Периферното прилагане на глюкоза по колебателен образец води до постоянни колебания в плазмената глюкоза. В нормални субекти, бета-клетката е способна да открие и отговори на повторими понижения на глюкозата с паралелни изменения в инсулиновата секреция. Това регулиране на инсулиновите секреторни колебания до колебанията на глюкозата терминира натоварването. Липсата на натоварване е ранна манифестация на бета-клетъчна дисфункция у индивиди с IGT и слаб NIDDM.

Използва се протокол за инфузия с колебателна глюкоза в ниски дози, доколкото тя е много чувствителен тест за способността на бета-клетката да чувства и отговаря на малки изменения в концентрациите на плазмена глюкоза. Изпитва се интегритетът на обратно свързваща глюкоза и инсулинова секреция. Нормалният отговор изисква способност за усещане за интактна глюкоза.

С оглед определяне дали бета-клетките са в състояние да открият и отговорят на колебанията на глюкозата, се инфузира глюкоза по колебателен маниер с малък обем солени разтвори за 12 h. Амплитудата на приложените колебания са 33% над и под средна стойност от 4 mg/kg/min и тяхната периодичност е 144 min.

За установяване ефекта на GLP-1 върху способността на бета-клетката да отговори на колебанията на глюкозата, се инфузира глюкоза по същия начин и GLP-1 се инфузира при постоянна стойност от 0.4 pmol/kg/min за пълни 12 h. Всяко изследване се състои от изходен 12-часов период (0700-0900), което да позволи достигане на стабилност. Следва период от 10 h (0900-1900) по време на който в 15-минутни интервали се взимат кръвни проби за глюкоза, инсулин, C-пептид и глюкагон и през 60-минутни интервали за GLP-1.

Средните нива на глюкоза са значително по-ниски в двете групи по време на GLP-1 инфузията в сравнение със соления разтвор, със средно напъване на 2.4 ± 0.5 mM у диабетици ($P < 0.0005$). Освен тази значителна редукция в концентрацията на плазмена глюкоза, средната стойност на ISR не се отличава значително по време на GLP-1 инфузията в сравнение с инфузията на солени разтвори в двете групи (таблица 4).

Таблица 4

Средни стойности на глюкоза и ISR при инфузия за 12 часа на
солен разтвор или GLP-1

ID	Средни стойности на глюкоза при 12 часа солени разтвор	Средни стойности на глюкоза при 12 часа GLP-1	Средни стойности на ISR при 12 часа солени разтвор	Средни стойности на ISR при 12 часа 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
Средно ± SEM	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
Средно ± SEM	14.59±1.3	9.40±0.9*	440.2±80.1	508±53.4

*P<0.05, чрез двоен t тест, се отнася до сравнение между инфузия със солени разтвор и GLP-1.

Средните инсулинови нива също се поддържат по време на инфузията с GLP-1 в сравнение със солени разтвори, с повишения от 102 ± 90 pmol/L; P = 0.32 у субекти с IGT и повишения 7 ± 12 pmol/L; P = 0.56 у субекти с NIDDM. Средните глюкагонови нива също не се различават по време на GLP-1 инфузията в сравнение с тези със солени разтвори (39.3 ± 5.4 pg/ml спрямо 39.4 ± 5.9 pg/ml; P = 0.94) у субекти с IGT и (46.4 ± 3.2 pg/ml спрямо 42.8 ± 5.4 pg/ml; P = 0.4) у субекти с NIDDM. Постигнатите нива на GLP-1 по време на инфузия с GLP-1 са 15.6 ± 4.6 pmol/L в сравнение с 2.0 ± 0.8 pmol/L по време на инфузията (P<0.001). Тези нива съответстват на постпрандиалните физиологични нива.

Пример 3 (Връзка между глюкоза и ISR у индивиди с IGT)

У нормалните субекти всяко пулсиране на глюкоза е тясно свързано с пулсиране в ISR. Това свързване по-рано е показано, че е дефективно у субекти с IGT. Профили на глюкоза и ISR по време на инфузията с колебателна глюкоза от един представителен субект с IGT, D02, са показани на фигури 3A и 3C. Тези резултати показват, че у субекти с IGT, по време на инфузията със солени разтвори, е налице загуба на тясна връзка между глюкоза и ISR с много глюкозонезависими колебания в ISR. В присъствието на физиологични постпрандиални нива на GLP-1 (фигури 3B и 3D), образците на инсулинови сек-

реторни отговори на глюкоза е подобрен у субекти с IGT, с всяка вибрация на глюкозата, последвано от колебание в ISR. Ето защо, GLP-1 подобрява способността на бета-клетките да натоварват ендогенната глюкозна инфузия у субекти с IGT.

Пример 4 (Връзка между глюкоза и ISR у индивиди с NIDDM)

Фигура 4 показва профилите на глюкоза и ISR от един субект с NIDDM, D07. В маркирания контраст у субекти с IGT, освен понижаването концентрацията на плазмена глюкоза и поддържането на ISR, образците на инсулинови секреторни отговори спрямо глюкоза не са подобри по време на GLP-1 инфузията (фигури 4B и 4D), с много глюкозни независими колебания в постоянните ISR. Профилите на глюкоза и ISR по време на колебателна глюкозна инфузия със солен разтвор са показани на фигури 4A и 4C.

Пример 5 (Влияние на GLP-1 върху спектралната сила в IGT и NIDDM)

За определяне на факта дали инсулиновата секреция е натоварена от глюкоза в отделните индивиди, темпоралните профили на инсулинова секреция се анализират чрез спектрален анализ. Анализът на спектралната сила се използва за преценка наличието на тясна връзка между колебанията в глюкозата и колебанията в ISR. Този метод дава възможност за оценка регулируемостта на инсулиновите секреторни колебания в предопределена честота. Спектралните пикове съответстват на доминантната периодичност и височината на пиковите съответстват на спектралната сила. Всеки спектър е нормализиран, обобщавайки общата вариабилност на всяка серия да бъде 100% и се експресира като нормализирана спектрална сила.

Средната нормализирана спектрална сила за глюкоза в субекти с IGT е 11.2 ± 1.5 по време на инфузията със солен разтвор и 13.2 ± 1.6 по време на GLP-1 инфузията ($P = 0.19$), и в субекти с NIDDM 6.5 ± 1.8 по време на инфузията със солен разтвор и 9.8 ± 0.7 по време на GLP-1 инфузия ($P = 0.18$). Фигура 5 ясно показва, че инфузията на GLP-1 у субекти с IGT повишени инсулинови секреторни отговори спрямо колебанията на плазмената глюкоза, води до по-висока степен на натоварване на инсулиновата секреция спрямо глюкоза. Влиянието се определя количествено чрез сравняване нормализираната спек-

трална сила на инсулиновите спектрални профили. Спектралната сила за ISR се повишава от 2.9 ± 1.4 по време на инфузията със солен разтвор до 8.9 ± 1.7 по време на GLP-1 инфузията; ($P < 0.006$) и е непроменено у индивиди с NIDDM (1.1 ± 0.5 до 1.5 ± 0.8 ; $P = 0.6$).

Спектралните анализи на колебателните глюкозни профили потвърждават съществуването на пикове в плазмения глюкозен спектър при 144 min, което съответства на периода на екзогенна глюкозна инфузия. Индивидуалната спектрална сила за глюкоза и ISR в един обект с IGT (фигури 6A и 6B) и един обект с NIDDM (фигури 6C и 6D) по време на инфузия на физиологичен разтвор и по време на инфузия на GLP-1 са показани на фигури 6A, включително 6D. Това съответства на данните, показани на фигури 3C и 3D, и фигури 4A и 4B. Спектралната сила е повишена от 0.6 до 8.9 в IGT субекта и е минимално променена от 0.28 до 1.51 у субекта с NIDDM. Пиковите в спектъра на плазмена глюкоза се появяват при 144 min. По време на инфузията със солен разтвор доминантният спектрален пик за ISR не се появява при 144 min, но вместо това - при 0.2. Спектралната сила с GLP-1 инфузия е 1.5.

По време на инфузията със солен разтвор има бедно натоварване (фиг. 3A), доколкото спектралната сила за ISR при 144 е 0.6. По време на GLP-1 инфузия (фиг. 3B) периодичността на доминантния спектрален пик в ISR се появява при 144 min, показвайки, че GLP-1 причинява натоварване на бета-клетките в този обект.

Средната стойност за нормализирана спектрална сила у контролни обекти с маркирано тегло (BMI 28.3) с нормален глюкозен толеранс е $7.2 \pm 0.6(9)$.

Резултатите от това изследване показват, че непрекъснатата инфузия на физиологични постпрангиални нива на GLP-1 редуцирани плазмени глюкозни концентрации и стимулирана инсулинова секреция в IGT и NIDDM обекти. Най-важното е, че GLP-1 възстановява способността на бета-клетките да усещат и отговарят на плазмената глюкоза във всички IGT субекти (определени количествено чрез нормализирана спектрална сила), с вариабилен отговор у субекти, които вече са развили NIDDM.

Възможните механизми, с които бета-клетъчната функция се подобрява чрез GLP-1 включва повишена регулация на чувстващите

глюкозата елементи, елиминирани на глюкотоксичността и подобрене на инсулиновата резистентност. GLP-1 и глюкоза проявяват синергистични инсулинотропни действия върху бета-клетките, включително стимулиране на циклично AMP формиране, инсулинова секреция, биосинтеза на инсулин и проинсулинова генна експресия.

Тези примери показват, че непрекъснатата инфузия на физиологични нива на GLP-1 редуцира концентрацията на плазмена глюкоза и стимулира инсулинова секреция в IGT и NIDDM субекти. Най-важното е, че GLP-1 възстановява способността на бета-клетката да усеща и отговаря на малки изменения в концентрациите на плазмена глюкоза в IGT субекти, само с вариабилен отговор в NIDDM субекти. У IGT субекти се наблюдава значително повишение в спектралната сила, измерване на бета-клетъчна функция, която не зависи от регулирането за изменения в инсулиновата чувствителност.

Патентни претенции

1. Използване на състав, включващ екзендин, или негово производно или аналог, и фармацевтичен носител за производството на лекарство за лечение на увреден глюкозен толеранс при индивиди, които нямат диабет.

2. Използване на състав, включващ екзендин, или негово производно или аналог, и фармацевтичен носител за производството на лекарство за подобряване на сферата на действие за сърдечносъдов случай или цереброваскуларен случай, свързан с увреден глюкозен толеранс.

3. Използване съгласно претенции 1 или 2, където съставът съдържа екзендин или негово производно или аналог в количество, необходимо за:

(а) увеличаване на чувствителността и реакцията на панкреатични бета-клетки на промени в плазмената глюкоза;

(б) увеличаване на редовните инсулинови отговори, или тяхната амплитуда, при реакция на промени в плазмената глюкоза;

(с) забавяне или спиране на загубата на контрол на плазмена глюкоза;

(d) забавяне или спиране на развитието на диабет, независим от инсулин;

(е) подобряване, отнасящо се до инсулинов секреторен отговор на бета-клетка спрямо екзогенни глюкозни колебания;

(f) подобряване на нормализирането на инсулинови секреторни образци;

(g) намаляване на нивата на плазмен инсулин; или

(h) намаляване на инсулинова устойчивост.

4. Използване на състав, съгласно всяка една от претенции от 1 до 3, където екзендинът или негово производно или аналог е екзендин-4, екзендин-3, или поради това получен пептиден вариант.

5. Използване на състав, съгласно всяка една от претенции от 1 до 4, където екзендинът или негово производно или аналог е изразен чрез полинуклеотид.

6. Използване на състав, съгласно всяка една от претенции от 1 до 5, където лекарството по-нататък включва съединение, което увеличава периода на полуразпад *in vivo* на екзендина или негово производно или аналог.

7. Използване на състава, съгласно претенция 6, където веществото е ковалентно свързано с екзендина или негово производно или аналог.

8. Използване на състав, съгласно всяка една от претенции от 1 до 5, където лечението по-нататък включва прилагане на съединение, което увеличава периода на полуразпад *in vivo* на екзендина или негово производно или аналог.

9. Използване на състав, съгласно всяка една от претенции от 1 до 8, където лекарството е под форма за интравенозно, подкожно, интрамускулно, интраперитонеално приложение, инжектиране на депо с поддържано освобождаване, дълбоко вдишване в белите дробове с поддържано освобождаване, устно приложение или приложение чрез пластр.

10. Използване на състав, съгласно всяка една от претенции от 1 до 9, където екзендинът или негово производно или аналог, се прилага при доза от 0.005 nmol/kg до 20 nmol/kg.

Приложение: 6 фигури

СЕКВЕНЦИОНЕН ЛИСТИНГ

<110> Goke, Burkhard

Byrne, Maria

<120> Глюкагоноподобен пептид-1 за усъвършенстване на β - клетъчен отговор спрямо глюкоза в субекти с увреден глюкозен толеранс

<130> P03986W00

<140> PCT/US99/10040

<141> 1999-05-07

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 37

<212> PTR

<213> бозайник

<400> 1

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 Gly

35

<210> 2

<211> 36

<212> PTR

<213> бозайник

64975

<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> PTR

<213> бозайник

<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> PTR

<213> бозайник

<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

64975

<210> 5

<211> 29

<212> PTR

<213> бозайник

<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> PTR

<213> бозайник

<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> PTR

<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

64975

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> PTR

<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> PTR

<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

64975

<210> 10

<211> 38

<212> PTR

<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> PTR

<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> PTR

<213> Heloderma suspectum

64975

<400> 12

His Ser Asp Ala Ile Phe Thr Ala 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> PTR

<213> Heloderma suspectum

<400> 10

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

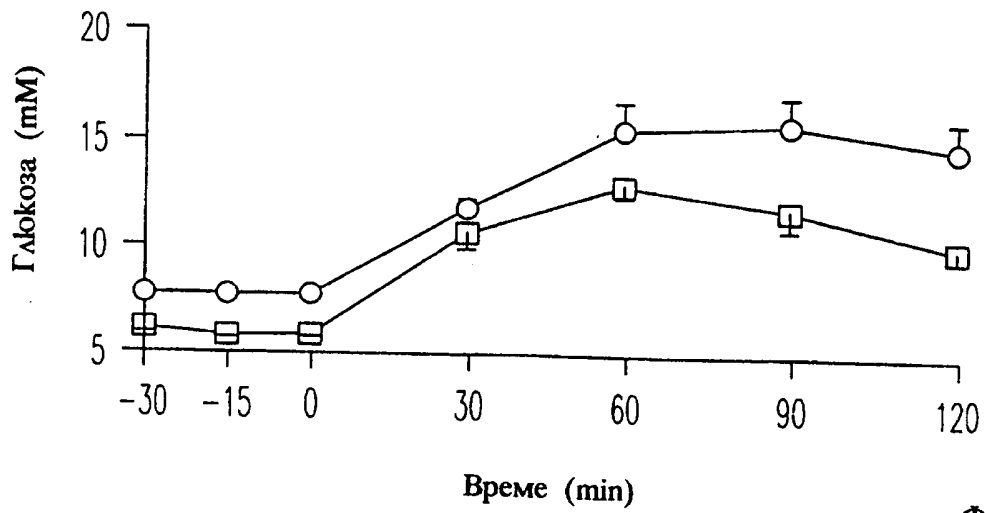
1 5 10 15

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

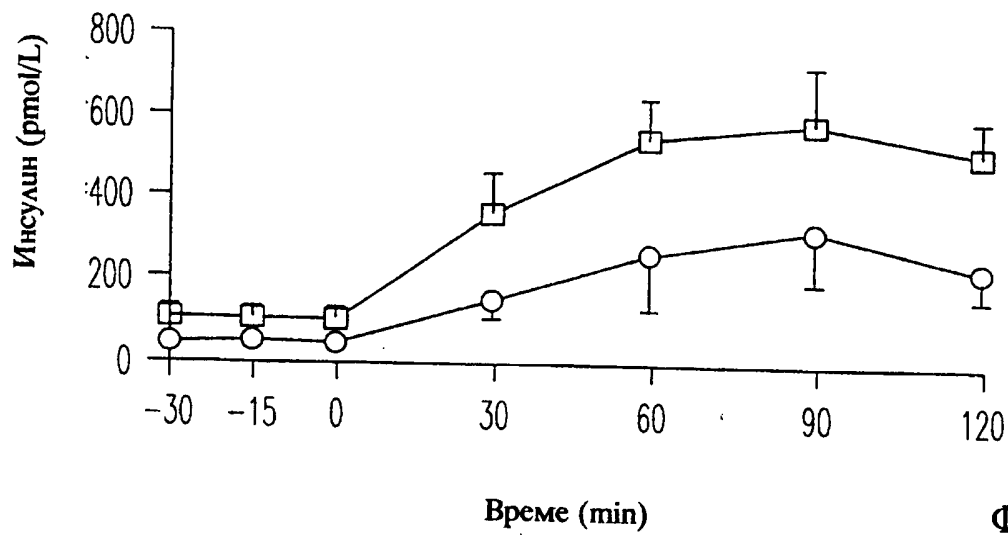
20 25 30

Pro Pro Pro

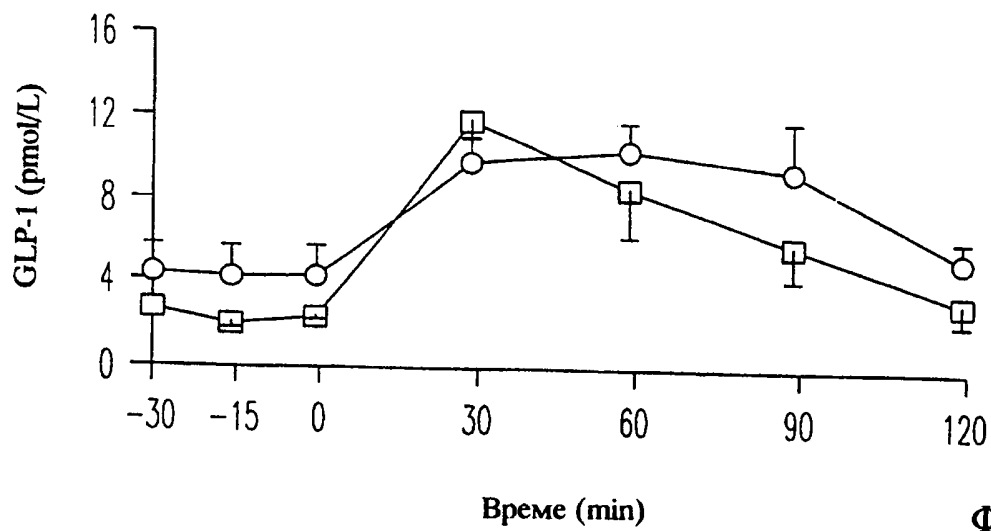
35



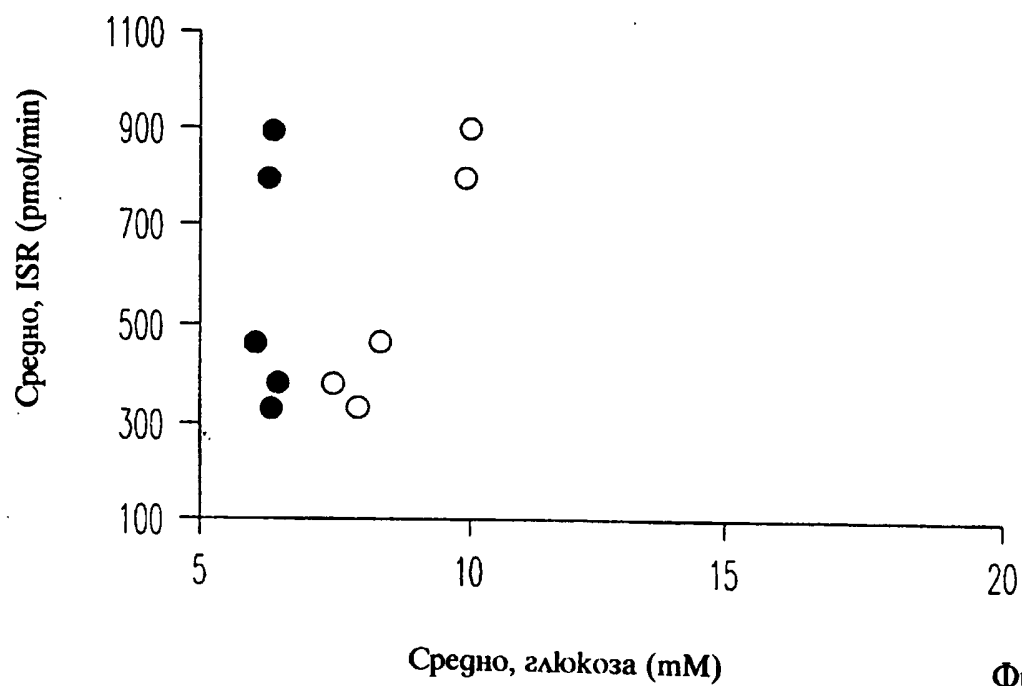
Фиг. 1A



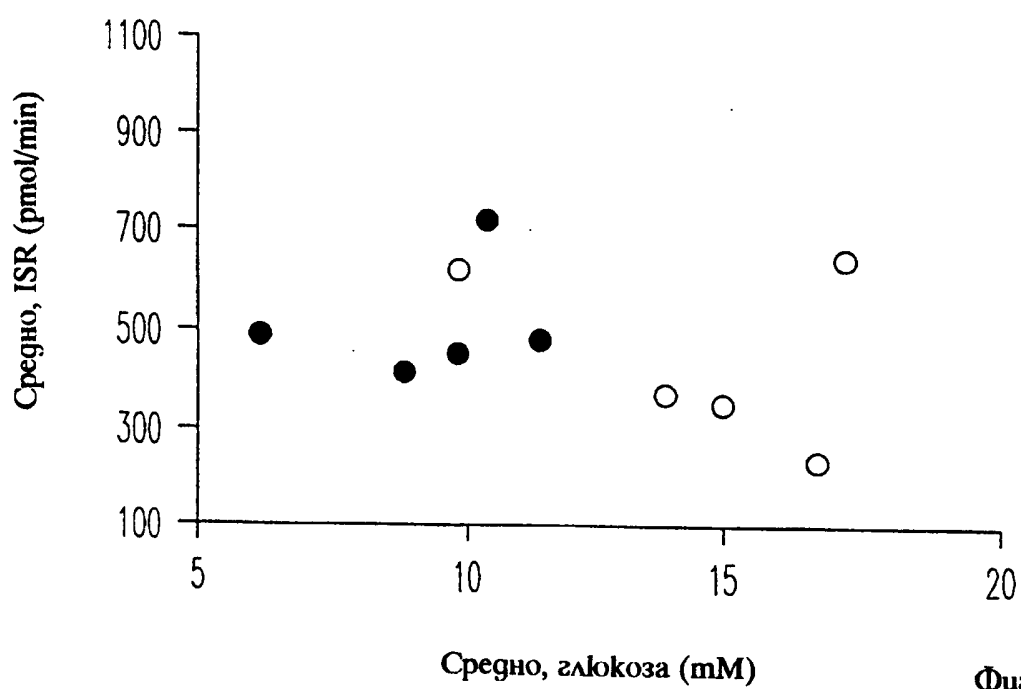
Фиг. 1B



Фиг. 1C

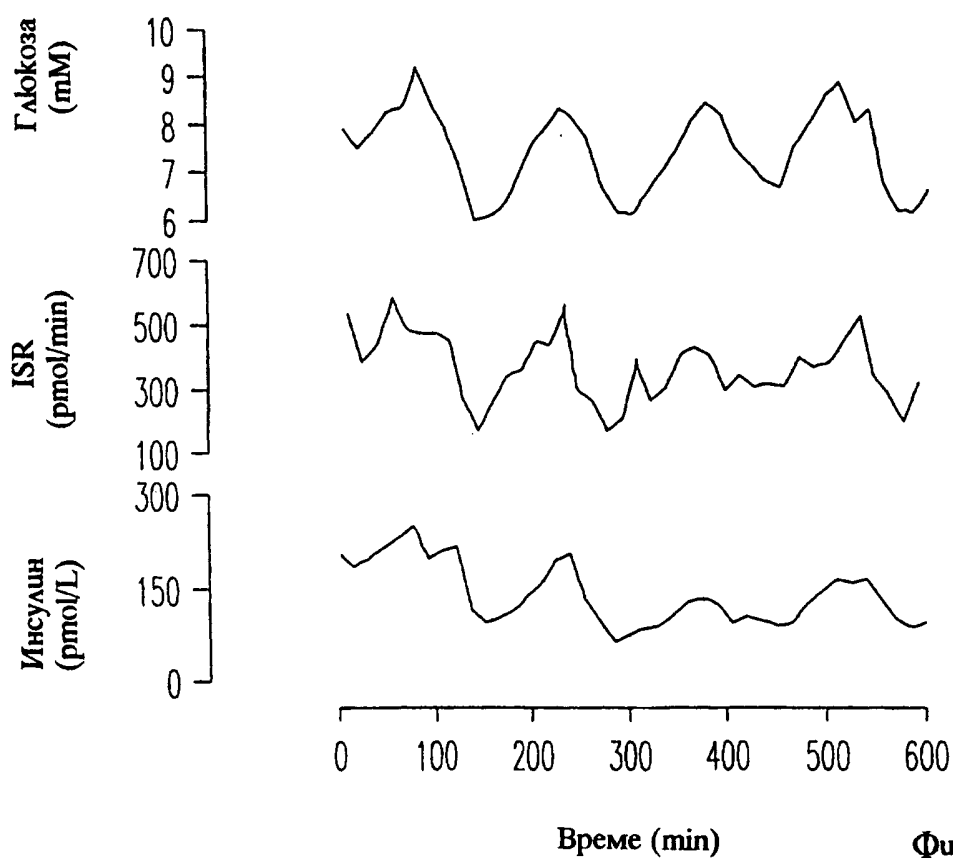


Фиг. 2А

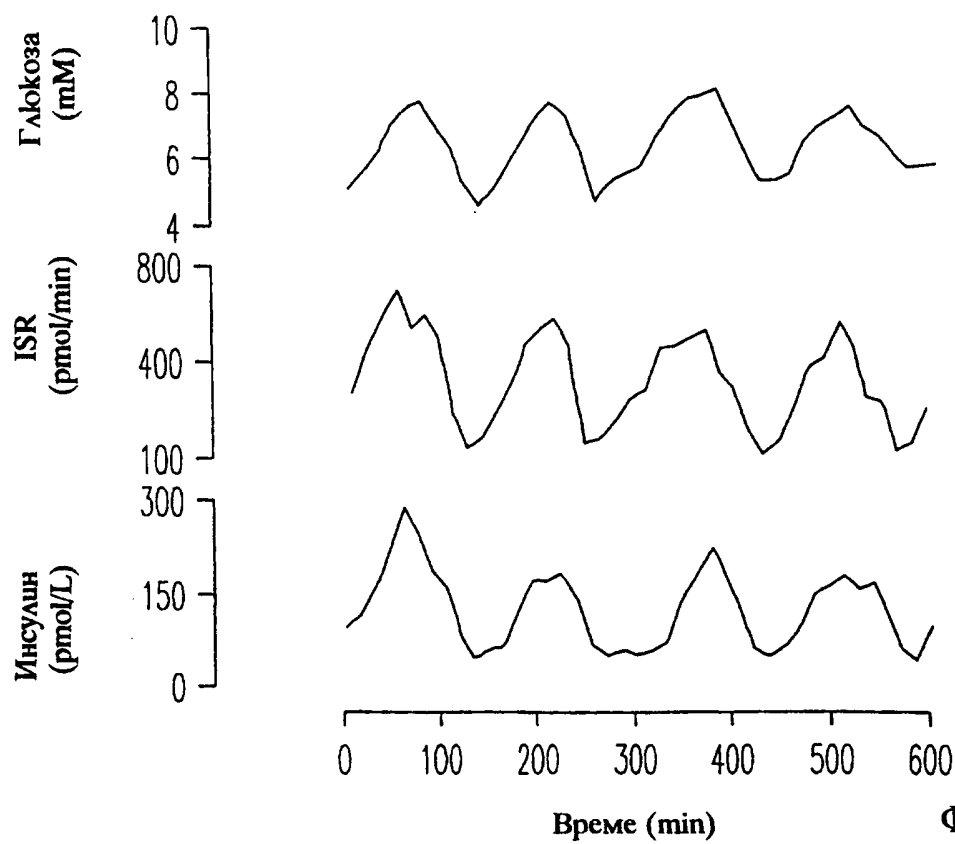


Фиг. 2В

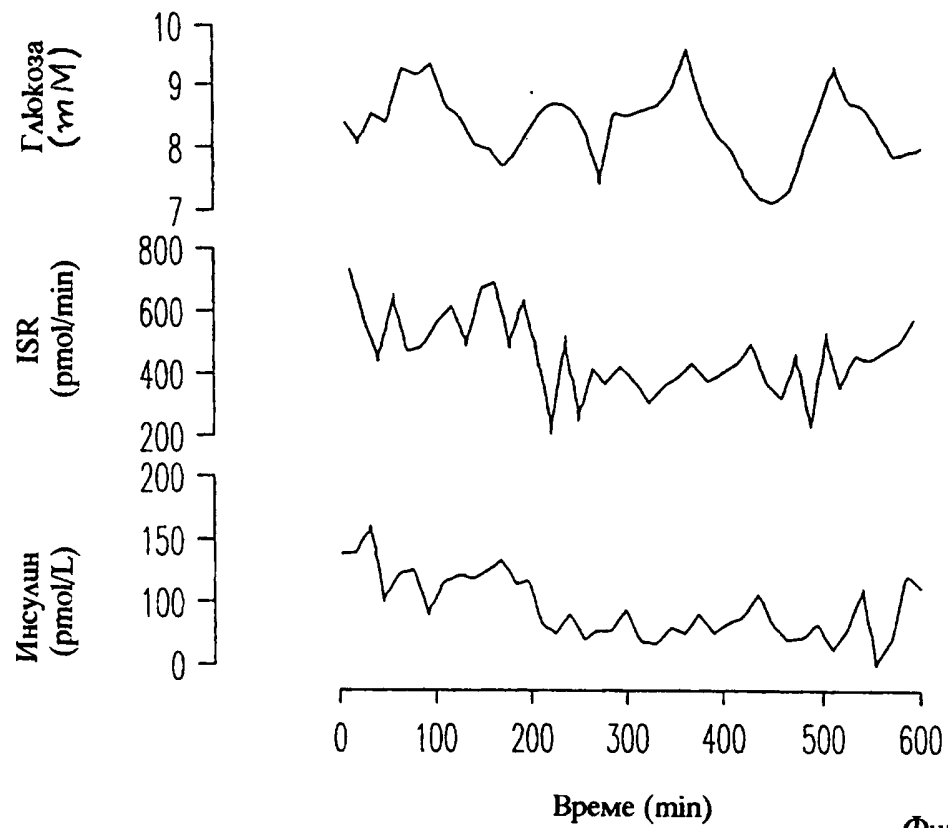
64975



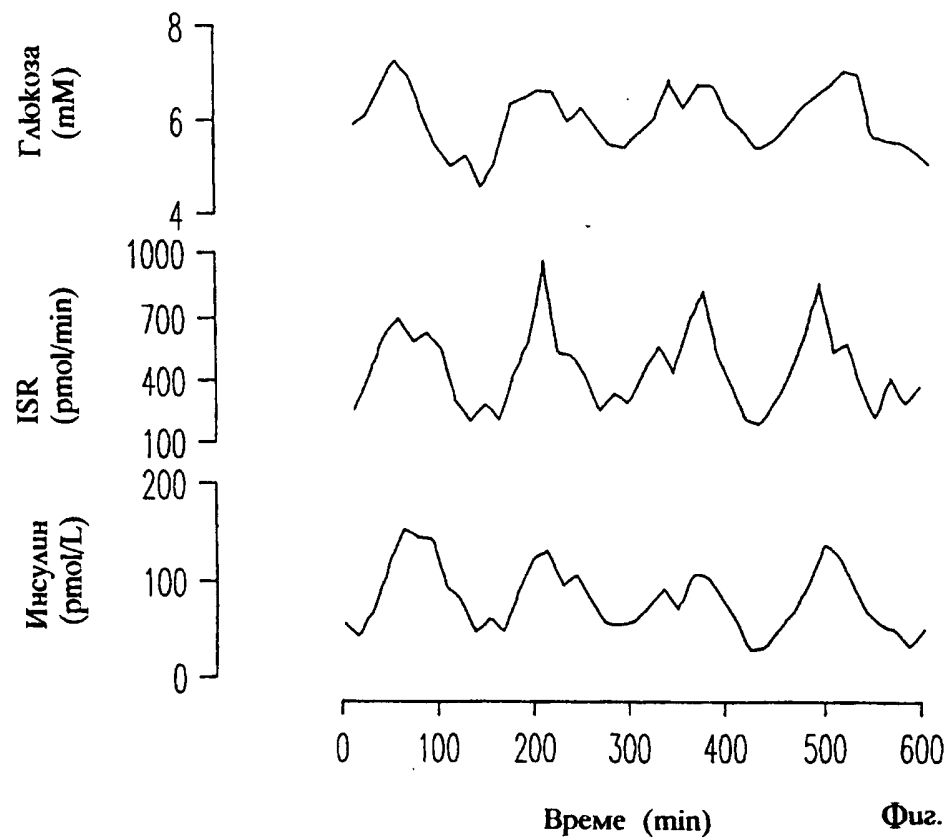
Фиг. 3А



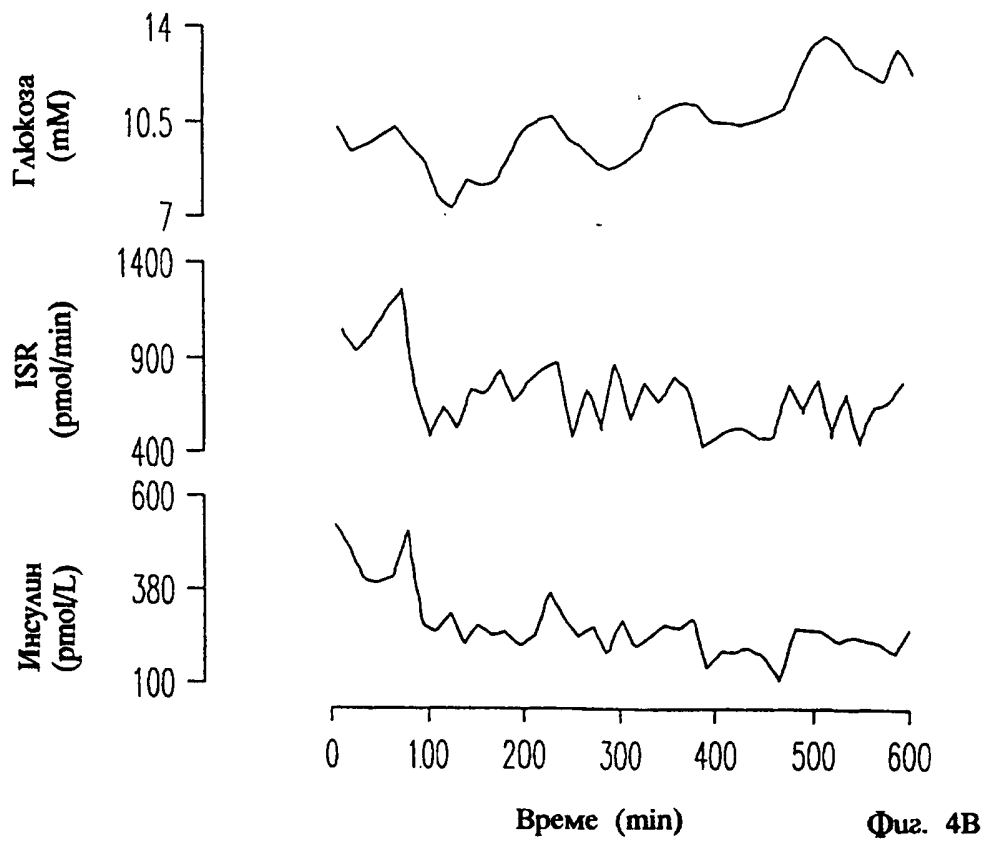
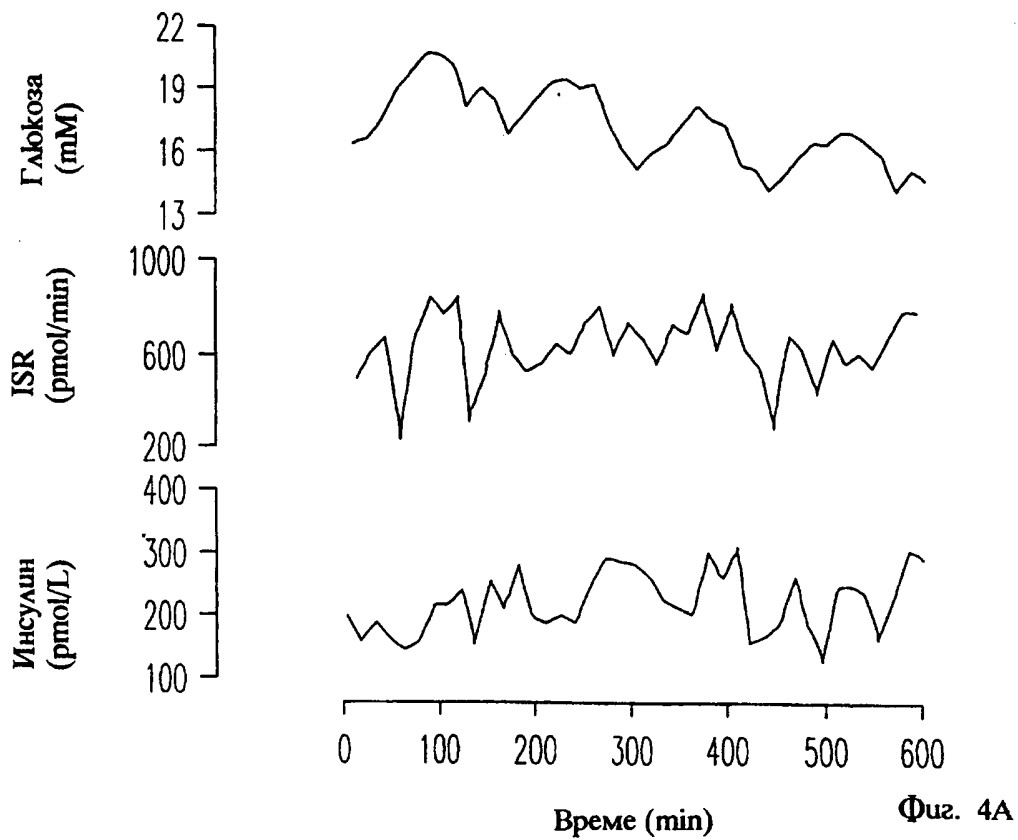
Фиг. 3В



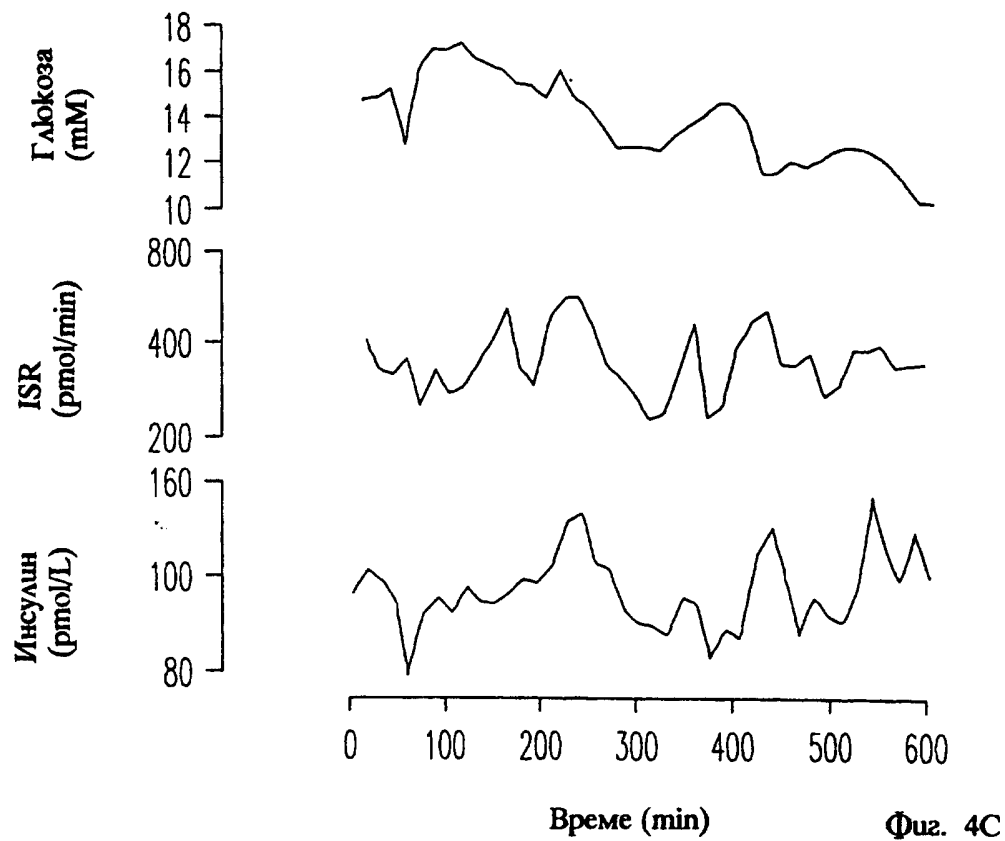
Фиг. 3C



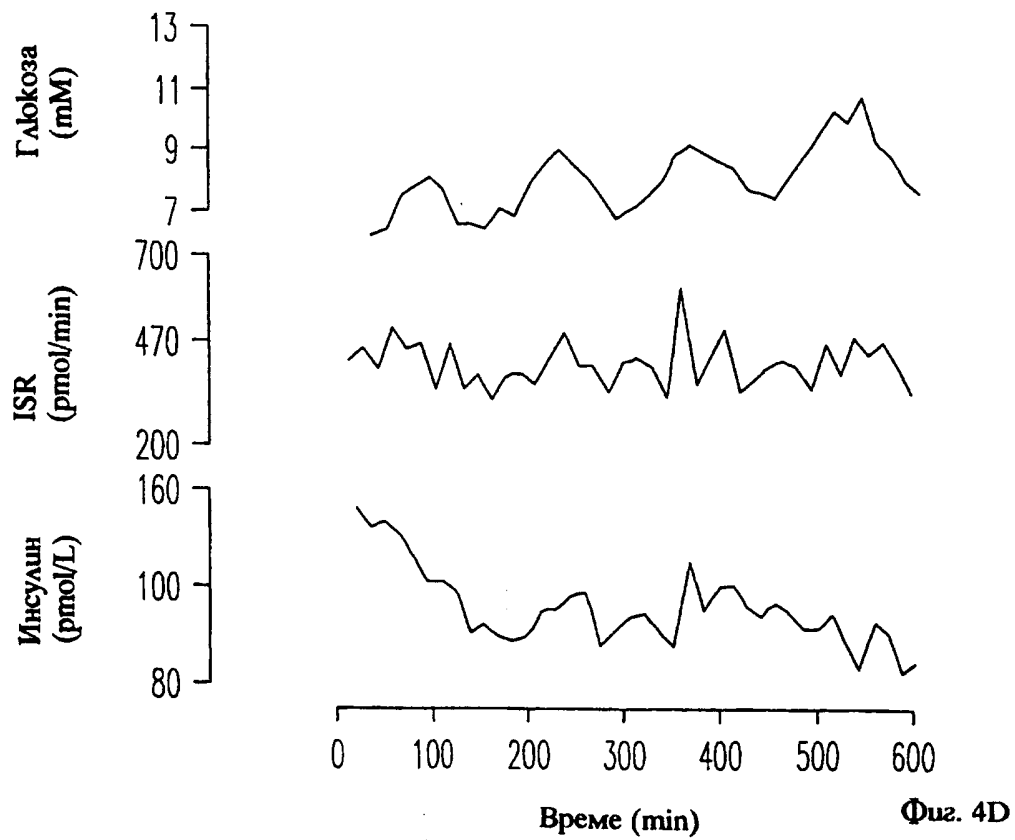
Фиг. 3D



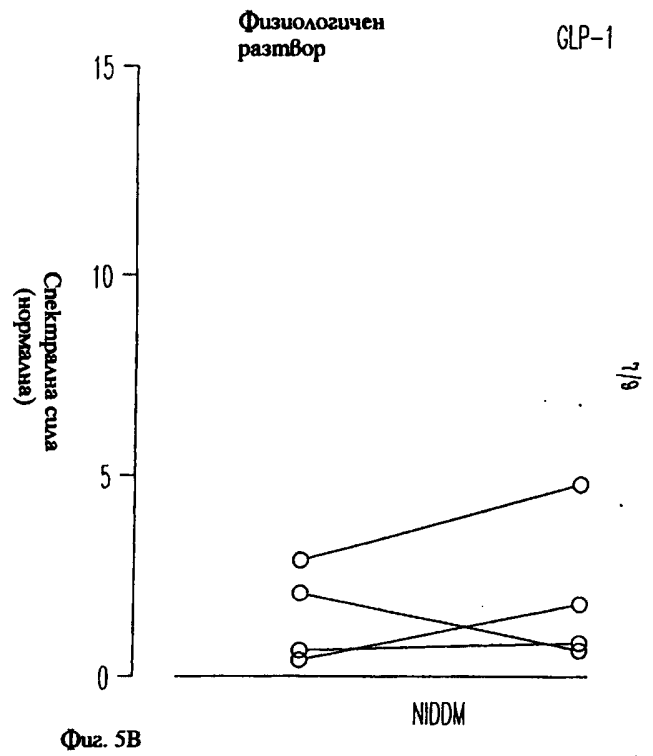
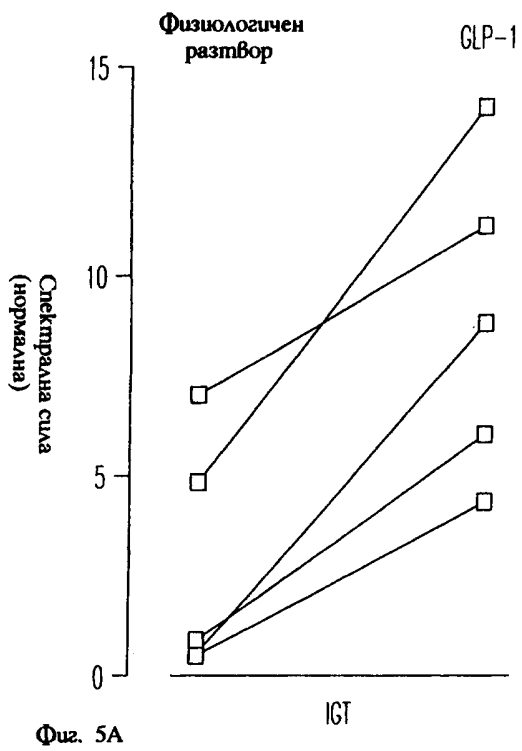
64975

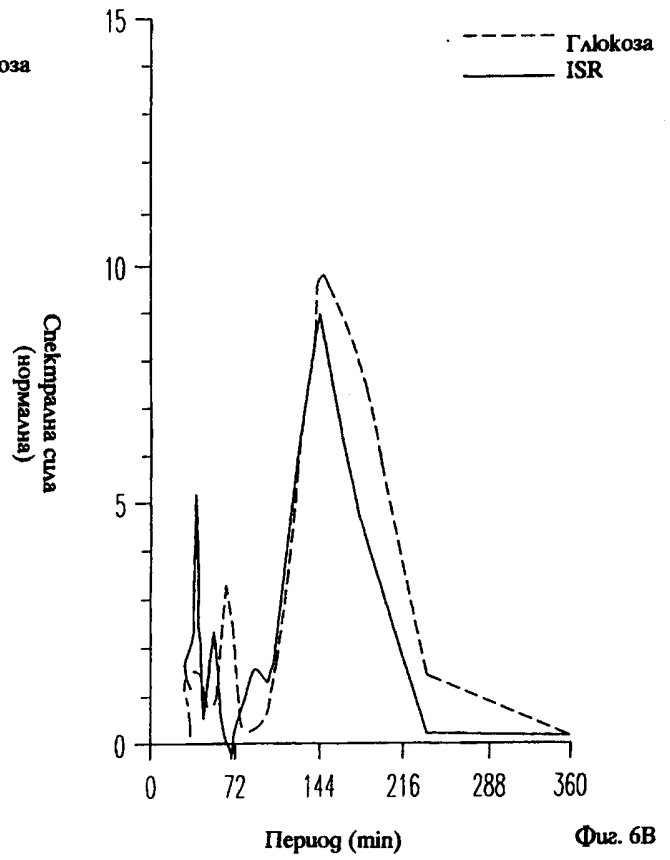
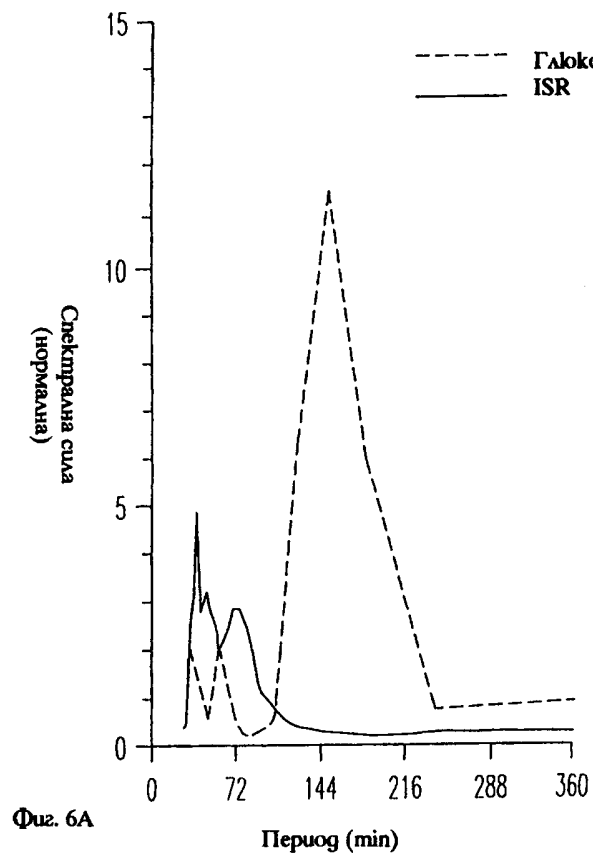


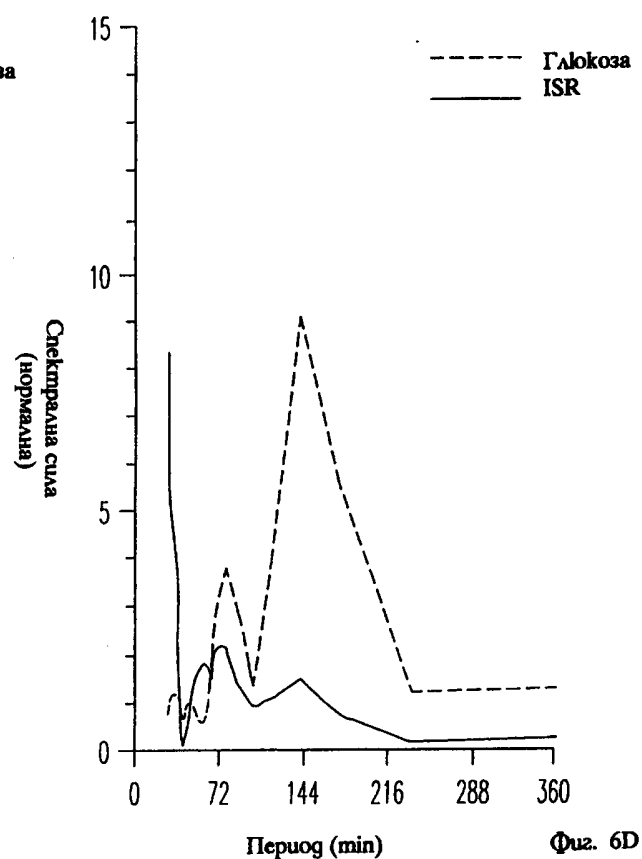
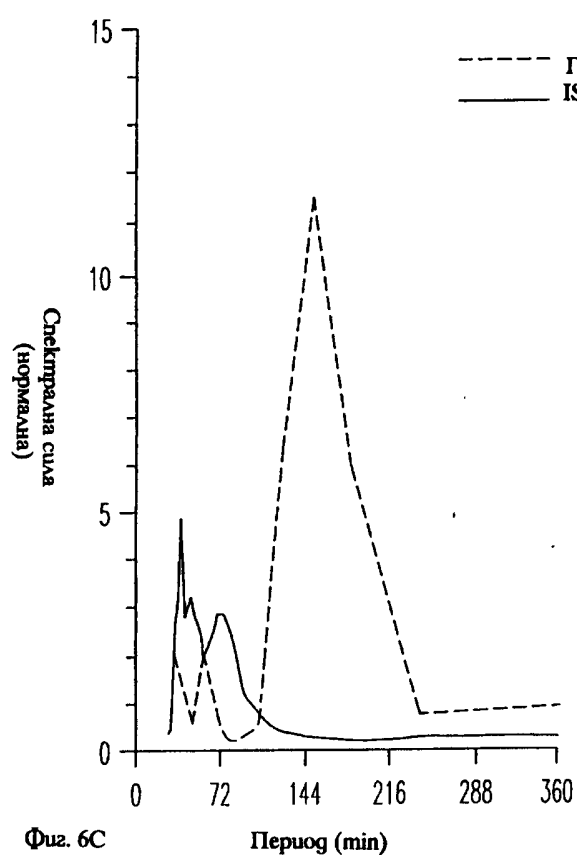
Фиг. 4C



Фиг. 4D







Издание на Патентното ведомство на Република България
1797 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Б. Шикаланова

Редактор: Е. Синкова

Пор. № 43352

Тираж: 40 СР