

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19) ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 07.05.1999
(32) Datum podání prioritní přihlášky: 12.06.1998
(31) Číslo prioritní přihlášky: 1998/089044
(33) Země priority: US
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 13.06.2001
(Věstník č. 6/2001)
(86) PCT číslo: PCT/US99/10040
(87) PCT číslo zveřejnění: WO99/64061

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 4614

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 38/26

A 61 P 3/10

(71) Přihlašovatel:
BIONEBRASKA, INC., Lincoln, NE, US;

(72) Původce:
Goke Burkhard, Marburg, DE;
Byrne Maria, Lincoln, NE, US;
Coolidge Thomas R., Lincoln, NE, US;

(74) Zástupce:
Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Glukagonu podobný peptid-1 zlepšuje odpověď
β-buněk na glukózu u subjektů se zhoršenou
tolerancí glukózy**

(57) Anotace:

Předmětem řešení je kompozice pro léčení zhoršené tolerance ke glukóze (IGT) obsahující sloučeninu, která se váže na receptor pro glukagonu podobný peptid-1 a farmaceutický nosič. Množství přítomné sloučeniny je efektivní množství pro zlepšení citlivosti pankreatických β-buněk ke hladinám krevní glukózy u lidí s IGT. Metoda slouží také pro zlepšení modelu odpovědi vylučováním inzulínu u lidí s IGT podáváním lidem kompozice obsahující sloučeninu, která se váže na receptor pro glukagonu podobný peptid-1 a farmaceutický nosič.

CZ 2000 - 4614 A3

GLUKAGONU PODOBNÝ PEPTID-1 ZLEPŠUJE ODPOVĚĎ β -BUNĚK NA
GLUKÓZU U SUBJEKTŮ SE ZHORŠENOU TOLERANCÍ GLUKÓZY

Oblast techniky

Vynález se týká přípravku obsahujícího sloučeninu vážící se na receptor „GLP-1“ a způsobu léčby zhoršené tolerance glukózy.

Dosavadní stav techniky

Zhoršená tolerance ke glukóze (IGT-impaired glucose tolerance) je běžná v americké populaci. Zatímco v běžné populaci ve věku 20 až 74 let je zhoršená tolerance ke glukóze 11 %, zvyšuje se na 24 % v populaci věku 40 až 75 roků s rodinným výskytem diabetes a tělesnou hmotností větší než 120 % normálu. U osob se zhoršenou tolerancí glukózy existuje vysoké riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění a rovněž vzniku diabetes mellitus nezávislé na inzulinu (NIDDM tj. non-insulin dependent diabetes mellitus), známé také jako diabetes typu 2.

Zhoršená tolerance glukózy je charakterizována prvotními nepatrnými defekty funkce β -buněk doprovázené inzulinovou rezistencí. Tyto prvotní defekty zahrnují zhoršenou schopnost β -buněk vnímat malé změny koncentrace glukózy v plazmě a odpovídat na ně vylučováním vhodných množství inzulinu a mírný posun doprava u křivky vyjadřující odpověď sekrecí inzulinu v závislosti na dávce glukózy. Citlivost ke glukóze a schopnost β -buněk rychle odpovědět sekrecí inzulinu se ztrácí velmi časně v průběhu IGT, kdy jsou 2hodinové hladiny glukózy minimálně zvýšeny. Zhoršení kontroly glukózy při IGT s časem je způsobeno zejména pokračováním zhoršování funkce β -buněk. To vede v mnoha případech ke zhoršování stavů hyperinsulinemie,

obezity a kardiovaskulárního onemocnění označovaného někdy jako syndrom X. V mnoha případech vedou pokročilé stavy IGT k definitivní ztrátě kontroly glukózy a k nástupu NIDDM.

Z uvedeného vyplývá, že stav IGT přináší závažná zdravotní rizika. Pacienti trpící IGT jsou často obézní a mají vysoké hladiny inzulinu v plazmě, které jsou často toxické. Tyto vysoké hladiny inzulinu způsobuje obecně neustále se zvyšující neschopnost svalů, jiných tkání a tukových buněk využívat inzulin k tomu, aby byla spotřebovávána glukóza z krevní plazmy. Stav IGT zvyšuje rizika vzniku celé řady kardiovaskulárních nemocí.

Glukagonu podobný peptid-1 (GLP-1 tj. glucagon-like peptide-1), přirozený střevní peptid, je vylučován střevními L-buňkami a působí jako hormon inkretin, který stimuluje vylučování inzulinu pankreatickými β -buňkami v závislosti na glukóze. Terapeutický potenciál tohoto peptidu při NIDDM byl již dříve demonstrován tak, že exogenní infuze farmakologických dávek GLP-1 obecně snižovaly hladiny glukózy v plazmě. Nicméně GLP-1 nezlepšil významně funkci β -buněk při 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 glukagon 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

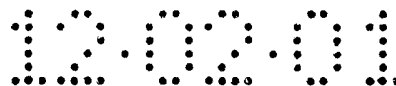


glukose by overnight infusion of glukagon-like peptide-1 (7-36) amide in patients with NIDDM, *Diabetes* 45:1524-1530, 1996; Rachman J, Barrow BA, Levy JC, Turner RC: Near-normalization of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM, *Diabetologia* 40: 205-211, 1997.

Stav IGT není v současné době vyléčitelný. Nicméně je rozpoznatelným onemocněním, které je spojeno s vážnými zdravotními riziky. Obecně se stav IGT postupně zhoršuje z hlediska jeho symptomů a často vede ke ztrátě kontroly glukózy vyskytující se v plazmě což vytváří diabetes typu 2. Zde je potřebná terapie.

Řada studií během posledních několika let ukázala, že aplikace GLP-1 v případech NIDDM snižuje hladiny glukózy a inzulinu v krvi a tak by měla být slibnou terapií pro tuto nemoc. Nicméně žádné studie zatím neukázaly, že GLP-1 má potenciál napravit ztrátu schopnosti β -buněk vnímat a rychle reagovat vylučováním inzulinu, když se zvýší hladina krevní glukózy. Je to právě toto zhoršení schopnosti odpovídat a úzce spojit vnímání zvýšení hladiny krevní glukózy s vylučováním inzulinu β -buněk, které je hlavní příčinou stavu IGT. V předchozích studiích ukázala aplikace GLP-1 na subjekty s NIDDM schopnost normalizovat hladinu glukózy v plazmě na lačno a stimulovat kumulativní vylučování inzulinu β -buněk. Nicméně infuze GLP-1 prováděné přes noc nezlepšily glukózové odpovědi na jídla podávaná následující den. Když byla infuze GLP-1 prováděna u osob s NIDDM po dobu 19 hodin, přes noc a během tří běžných jídel, zredukovala se hladina glukózy v plazmě, ale zhoršená postprandiální funkce β -buněk se zlepšila pouze nepatrně.

Odpovědi β -buněk na prodlouženou infuzi GLP-1 nebyly dříve studovány u subjektů s IGT a protože nebyly žádné náznaky, že by výsledky mohly být odlišné než u infuzí GLP-1 v případě NIDDM, nebyly dosud prováděny podrobné studie



vlivu GLP-1 na odpovědi β -buněk na malé zvyšování a snižování koncentrací glukózy v plazmě.

Z uvedeného vyplývá potřeba metody, která by zastavila postup IGT a obnovila normální stav metabolismu glukózy.

Proto je cílem předkládaného vynálezu zajistit metodu umožňující obnovit nebo zlepšit funkci β -buněk a jejich citlivost a tím vylučování inzulínu v odpovědi na hladiny glukózy v plazmě u osob majících zhoršenou toleranci ke glukóze.

Dalším cílem vynálezu je zajistit způsob, který zpozdí nebo zabrání zhoršování funkce β -buněk, která je zodpovědná za progresi zhoršené tolerance ke glukóze až ve ztrátu regulace glukózy v plazmě což charakterizuje nástup NIDDM.

Dalším cílem vynálezu je zmírnit vlivy IGT vedoucí ke kardiovaskulárním nemocem, a tak snížit rizika těchto nemocí a mrtvic.

Způsob splňující tyto a další cíle bude zřejmý z následujícího detailního popisu.

Podstata vynálezu

Vynálezci objevili, že aplikace GLP-1 subjektům se sníženou tolerancí ke glukóze obnoví úzce koordinovanou odpověď vylučováním inzulínu na zvýšení hladin glukózy v plazmě a tak znovu nastaví průběh inzulínové odpovědi β -buněk na vzrůst hladiny glukózy v plasmě, který je charakteristický pro normální subjekty, které netrpí IGT.

Předkládaný vynález je zaměřen na způsob léčby osob trpících zhoršenou tolerancí ke glukóze a inzulínovou rezistencí s použitím GLP-1 v množství účinném k obnovení, zlepšení nebo normalizaci citlivosti a funkce β -buněk a vylučování inzulínu. Vynález je také zaměřen na způsob snižování hladiny inzulínu v plazmě u osob s IGT a souběžně redukci stavu inzulínové rezistence a ji provázejících kardiovaskulárních onemocnění.



Při provádění zde popsaných příkladů vynálezci překvapivě pozorovali, že aplikace GLP-1 u subjektů s IGT, v kontrastu k náhodné a nekoordinované inzulinové odpovědi charakteristicky se vyskytující u subjektů s IGT, dramaticky obnovuje citlivé, rychlé a koordinované vylučování inzulinu β -buňkami v odpovědi na jednotlivé pulzační zvyšování koncentrace glukózy v plazmě, podobné modelu vylučování inzulinu u normálních pacientů.

Vynálezci objevili, že podávání GLP-1 subjektům se zhoršenou tolerancí ke glukóze (IGT) obnovuje nebo zlepšuje funkci pankreatických β -buněk a schopnost β -buněk rychle odpovídat vylučováním inzulinu koordinovaným způsobem v odpovědi na malá zvýšení nebo změny koncentrace glukózy v plazmě tj. pulzačním vylučováním inzulinu podobným způsobem, jako probíhá vylučování inzulinu u subjektů bez IGT. Tento způsob vylučování inzulinu není obnoven u subjektů, u nichž je již rozvinut stav NIDDM, který je charakterizován ztrátou regulace glukózy v plazmě.

Funkce β -buněk je kvantifikována normalizovanou spektrální silou. Spektrální síla měří funkci β -buněk, která nezávisí na nastavení citlivosti pro inzulin. Vynálezci zjistili, že u subjektů s IGT zlepšuje GLP-1 spektrální sílu na normální rozsah. Profily spektrálních sil indikují, že úzká koordinace glukózy v plazmě a oscilací vylučování inzulinu byla u subjektů s IGT po podávání GLP-1 obnovena na normální úroveň. Toto zlepšení oscilačního modelu vylučování inzulinu je důležité pro udržení normální homeostáze glukózy. Například bylo ukázáno, že inzulinové infuze, které napodobují ultradiální oscilace s periodou 120 minut, jsou efektivnější pro redukci koncentrací glukózy v plazmě, než konstantní infuze inzulinu (27).

Předkládaný vynález zajišťuje kompozici zahrnující sloučeninu, která se váže na receptor pro glukagonu podobný peptid-1 a je účinná pro zlepšení schopnosti β -buněk vnímat a odpovídat na malé změny v koncentracích glukózy v plazmě

u subjektů s IGT. V jednom provedení je sloučeninou vážící se na receptor glukagonu podobný peptid-1. V jiném provedení je sloučeninou vážící se na receptor variantní peptid ve kterém se kombinace substitucí, delecí a variant neliší o více než 10 aminokyselin od glukagonu podobného peptidu-1. Sloučenina vážící se na receptor může dále zahrnovat polynukleotid nebo látku, která aktivuje uvolňování GLP-1, molekulu, která aktivuje receptor pro GLP-1, nebo sloučeninu vážící se na receptor pro GLP-1, zahrnující chemicky konstruovanou molekulu, analogy peptidů nebo agonisty GLP-1.

Vynálezci objevili, že podávání lidského GLP-1 zlepšuje nebo obnovuje odpověď vylučováním inzulínu na malé změny nebo zvýšení glukózy v plazmě. V souladu s tím je kompozice podle předkládaného vynálezu užitečná pro terapii vedoucí k normalizaci zhoršené tolerance ke glukóze.

Vynálezci zde demonstrovali, že infuze nízkých dávek GLP-1 může zlepšit funkci β -buněk, aby vylučovaly inzulín v odpovědi na zvýšené hladiny glukózy v plazmě. GLP-1 může být rovněž použit ke zlepšení zachování funkce β -buněk u subjektů s IGT. Podávání GLP-1 také reguluje nebo normalizuje modely vylučování inzulínu, což způsobí celkové snížení inzulínu v plazmě při IGT. Tato normalizace snížením způsobí omezení stavu rezistence k inzulínu (inzulinové rezistence).

Termín "GLP-1" označuje glukagonu podobný peptid a zahrnuje mimetika GLP-1 a tak, jak je používán v kontextu překládaného vynálezu, může zahrnovat glukagonu podobné peptidy a příbuzné peptidy a analogy glukagonu podobného peptidu-1, které se váží receptorový protein pro glukagonu podobný peptid-1 (GLP-1), takové jako je GLP-1 (7-36) amid receptorový protein, a mají odpovídající biologický efekt na sekreci inzulínu, jako GLP-1 (7-36) amid, který je nativní, biologicky aktivní formou GLP-1. Viz Goke, B and Byrne, M, *Diabetic Medicine*, 1996, 13:854-860. Receptory pro GLP-1 jsou bílkoviny na povrchu buněk nalézající se

například na pankreatických β -buňkách produkujících inzulin. Glukagonu podobné peptidy a analogy budou zahrnovat druhy mající inzulinotropní aktivitu a které jsou agonisty, tj. aktivují receptorovou molekulu pro GLP-1 a její druhou mediátorovou (messenger) aktivitu mimo jiné na β -buňky produkující inzulin. Agonisté, kteří vykazují aktivitu skrze tento receptor byli popsáni 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). Glukagonu podobné molekuly zahrnují polynukleotidy jejichž expresí vznikají agonisté GLP-1, tj. aktivátory receptorové molekuly pro GLP-1 a její sekundární mediátorové aktivity nacházející se mimo jiné na β -buňkách produkujících inzulin. Látky napodobující (mimetika) GLP-1, které jsou také agonisty β -buněk, zahrnují například chemické sloučeniny specificky navržené k aktivaci receptoru pro GLP-1. Antagonisté glukagonu podobného peptidu-1 jsou také známi, viz například Watanabe, Y. et al., *J. Endocrinol.* 140(1):45-52 (1994), a zahrnují exendin (9-39) amin, analog exendinu, který je účinným antagonistou receptorů pro GLP-1 (viz např. WO97/46584). Nedávné publikace popisují GLP-1 z černé vdovy (Black Widow GLP-1) a Ser² GLP-1, viz 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.

Následující provedení zahrnují chemicky syntetizované glukagonu podobné polypeptidy a rovněž tak jakékoliv polypeptidy nebo jejich fragmenty, které jsou podstatně homologní. "Podstatně homologní", což se může vztahovat na

nukleové kyseliny i sekvence aminokyselin, znamená, že sekvence určitého subjektu, například sekvence mutantu, se liší od referenční sekvence jednou nebo více substitucemi, delecemi (vynecháními) nebo adicemi (přidáními) a tyto odlišnosti nezpůsobí nepříznivou změnu funkce dané sekvence vzhledem k sekvenci referenční. Pro účely tohoto vynálezu jsou za podstatně homologní považovány sekvence mající větší než 50% homologii a přednostně větší než 90% homologii, ekvivalentní biologickou aktivitu v β -buňkách se zlepšenými odezvami na hladiny glukózy v plazmě a ekvivalentní expresní charakteristiky. Pro účely určování homologie by mělo být ignorováno zkrácení přirozené sekvence. Sekvence, které mají menší stupně homologie, srovnatelnou bioaktivitu a ekvivalentní expresní charakteristiky jsou považovány za ekvivalentní.

Savčí GLP peptidy a glukagon jsou kódovány stejným genem. V ileu je fenotyp zpracováván na dvě hlavní třídy GLP peptidových hormonů, jmenovitě GLP-1 a GLP-2. Jsou známy čtyři proteiny příbuzné GLP-1, které jsou tvořeny z fenotypových peptidů. GLP-1 (1-37) má sekvenci 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 amidován v posttranslačním procesu a vzniká GLP-1 (1-36) NH_2 , který má sekvenci 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 (NH_2) (SEQ.ID NO:2); nebo je měněn enzymaticky a tvoří se GLP-1 (7-37), který má sekvenci 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) může být také amidován a vzniká GLP-1 (7-36) amid, který je přirozeně se vyskytující formou molekuly GLP-1 a který má sekvenci 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 (NH_2) (SEQ.ID NO:4) a v přirozené formě je molekulou GLP-1.

Střevní L-buňky vylučují GLP-1 (7-37) (SEQ. ID NO:3) a GLP-1 (7-36) NH₂ (SEQ.ID NO:4) v poměru 1 ku 5 v uvedeném pořadí. Tyto zkrácené formy GLP-1 mají krátký poločas životnosti in situ, tj. méně než 10 minut a jsou inaktivovány aminodipetidázou 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). Bylo spekulováno, 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) ovlivňují produkci jaterní glukózy, ale nestimulují produkci nebo uvolňování inzulinu ze slinivky (pankreatu).

V jedech z ještěrky korovce se nachází 6 peptidů, které jsou homologní s GLP-1. Jejich sekvence jsou v tabulce 1 porovnány se sekvencí GLP-1.

Tabulka 1

- a. H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K
G R NH₂
- b. H S D G T F T S D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N
G G P S S G A P P P S NH₂
- c. D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N G G P S
S G A P P P S NH₂
- d. H G E G T F T S D L S K Q M E E E A V R L F I E W L K N
G G P S S G A P P P S NH₂
- e. H S D A T F T A E Y S K L L A K L A L Q K Y L E S I L G
S S T S P R P P S S
- f. H S D A T F T A E Y S K L L A K L A L Q K Y L E S I L G
S S T S P R P P S S
- g. H S D A I F T E E Y S K L L A K L A L Q K Y L A S I L G
S R T S P P P NH₂

h. H S D A I F T Q Q Y S K L L A K L A L Q K Y L A S I L G
S R T S P P P 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)

Hlavní homologie, které ukazuje tabulka 1 jsou: peptid c, resp. h je odvozen od peptidu b, resp. g. Všech 6 přirozeně se vyskytujících peptidů (a, b, c, d, e, g) je homologních v pozici 1, 7, 11 a 18. GLP-1 a exendiny 3 a 4 (a, b, d) jsou dále homologní v pozicích 4, 5, 6, 8, 9, 15, 22, 23, 25, 26 a 29. V pozici 2 jsou A, S a G strukturně podobné. V pozici 3 jsou zbytky D a E (Asp a Glu) strukturně podobné. V pozicích 22 a 23 jsou F (Phe) a I (Ile) strukturně podobné s Y (Tyr), resp. L (Leu), v uvedeném pořadí. Podobně v pozici 26 L a I jsou strukturně ekvivalentní.

Tak z 30 zbytků GLP-1 jsou exendiny 3 a 4 identické v 15 pozicích a ekvivalentní v 5 dalších pozicích. Jediné pozice, kde jsou evidentní radikální strukturní změny, jsou na zbytcích 16, 17, 19, 21, 24, 27, 28 a 30. Exendiny mají také 9 dalších zbytků na karboxylovém konci.

Peptidy podobné GLP-1 mohou být vyrobeny chemickou syntézou peptidů na pevné fázi. GLP-1 může být také vyroben konvenčními rekombinantními technikami, které používají standardních metod, které popsali například Sambrook a Maniatis. "Rekombinantní", tak jak je zde používáno, znamená, že protein pochází z rekombinantních (například mikrobiálních nebo savčích) expresních systémů, které byly geneticky modifikovány, aby obsahovaly expresní gen pro GLP-1 nebo jeho biologicky aktivní analogy.

Peptidy podobné GLP-1 mohou být izolovány a purifikovány z kultur rekombinantních buněk metodami, které zahrnují, ale nejsou omezeny na srážení síranem amonným nebo etanolem, kyselou extrakci, chromatografii na měničích aniontů nebo kationtů, chromatografii na fosfocelulóze, chromatografii s hydrofobní interakcí, afinitní chromatografii, hydroxylapatitovou chromatografii a lektinovou chromatografii. Pro finální purifikační kroky může být využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Polypeptidy předkládaného vynálezu mohou být přírodní purifikované produkty, nebo produkty postupů chemické syntézy, nebo mohou být produkovány rekombinantními technikami z prokaryotických i eukaryotických hostitelských buněk (například buňky bakterií, kvasinek, vyšších rostlin, hmyzí a savčí buňky v kultuře nebo *in vivo*). V závislosti na hostitelských buňkách používaných při postupu využívajícím rekombinantní produkci, polypeptidy předkládaného vynálezu nejsou obecně glykosylované, ale mohou být glykosylované.

Aktivita GLP-1 může být určována standardními metodami, obecně postupy vyšetřujícími vazebnou aktivitu vzhledem k receptoru, což zahrnuje zajištění vhodných buněk, které exprimují receptor pro GLP-1 na svém povrchu, například buněčné linie inzulinomu jako buňky RINmSF nebo buňky INS-1. Viz také Mojsov, S. (1992) a EP0708170A2. Kromě měření specifické vazby molekuly s radioaktivní značkou na membránu s použitím metod radioimunoanalýzy, může být také měřena aktivita cAMP nebo produkce inzulinu závislá na glukóze. V jedné metodě je polynukleotid kódující receptor předkládaného vynálezu použit k transfekci buněk, aby produkovaly receptorový protein pro GLP-1. Tak například mohou být tyto metody použity pro vyhledávání agonisty k receptoru (látka vážící se specificky na daný receptor) kontaktováním takových buněk látkami z nichž se vyhledává a určením zda takové látky generují signál, tj. aktivují receptor.

Pro použití v zde popsaných metodách mohou být použity pro detekci čistoty a identifikaci peptidů podobných GLP-1 polyklonální a monoklonální protilátky. Protilátky takové jako ABGA1178 detekují intaktní neštěpený GLP-1 (1-37) nebo na N konci zkrácený GLP-1 (1-37) nebo (7-36) amid. Jiné protilátky jsou schopny detekce na úplném C-konci molekuly prekursoru postupem, který umožňuje odečtením vypočítat množství biologicky aktivního zkráceného peptidu, tj. GLP-1 (7-37) nebo (7-36) amidu (Orskov et al. Diabetes, 1993, 42:658-661; Orskov et al. J. Clin. Invest. 1991, 87:415-423).

Další vyhledávací techniky zahrnují použití buněk, které exprimují receptor pro GLP-1, například CHO buňky po transfekci, v systému, který měří extracelulární pH (vně buňky) nebo iontové změny způsobené aktivací receptoru. Potenciální agonista může být například kontaktován s buňkami, které exprimují receptorový protein pro GLP-1 a může být měřena druhotná odezva, jako například transdukce signálu nebo změny iontové síly nebo změny pH, aby se určilo zda je potenciální agonista efektivní.

Receptorové proteiny vážící glukagonu podobný peptid-1 používané v předkládaném vynálezu mohou být použity v kombinaci s vhodným farmaceutickým nosičem. Taková kompozice zahrnuje terapeuticky efektivní množství polypeptidu a farmaceuticky přijatelný nosič nebo excipient. Takové nosiče zahrnují, ale nejsou omezeny na salinický roztok, pufrovaný salinický roztok, dextransu, vodu, glycerol, etanol, laktózu, fosfát, manitol, arginin, trehalózu a jejich kombinace. Tyto přípravky by měly být vhodné pro podávání a rychle zjistitelné těmi, kteří mají potřebné dovednosti v tomto oboru. Peptid GLP-1 může být také používán v kombinaci s činidly, o kterých je známo, že zvyšují poločas životnosti peptidu *in vivo*, aby se zvýšila nebo prodloužila biologická aktivita peptidu. Například může být na kompozici podle vynálezu před vlastním podáváním kovalentně vázána molekula nebo chemická skupina. Alternativou je podávání činidla zvyšujícího poločas

životnosti souběžně s kompozicí. Další možností je, že činidlo které může obsahovat molekulu o níž je známo, že inhibuje enzymovou degradaci peptidů jako GLP-1, může být podáváno souběžně nebo až po podávání kompozice obsahující peptid GLP-1. taková molekula může být podána například ústy nebo injekčně.

GLP-1 může být podáván intravenózně nebo injekčně a může být podáván kontinuálně nebo jednorázovou injekcí. Totální podávání může být současně s infuzí nebo injekcí glukózy i po ní a před ní. Mohou být použity následující dávky: pro kontinuální infuzi (I.V.) 0,1 pmol/kg/min až 10 pmol/kg/min a pro podkožní (S.C.) 0,1 pmol/kg/min až 75 pmol/kg/min a pro jednorázovou nitrožilní injekci (I.V.) 0,005 nmol/kg až 20 nmol/kg a pro jednorázovou podkožní injekci (S.C.) 0,1 nmol/kg až 100 nmol/kg.

Kontinuální aplikace peptidu GLP-1 je upřednostňovanou metodou podávání. Nicméně GLP-1 může být podáno podkožně, nitrosvalově, interperitoneálně, injekční dávkou s postupným uvolňováním, hlubokým vdechnutím do plic s prodlouženým uvolňováním a rovněž nitrožilní a ústní cestou nebo jinými metodami.

Účinné léčení IGT také snižuje riziko kardiovaskulárních a mozkových cévních příhod. To může být tedy prevencí zajišťovanou pacientům kde je známo vysoké riziko takových příhod.

Popis obrázků na výkresech

Obrázek 1 znázorňuje glukózu, inzulin a GLP-1 v odezvě na podání 75 mg glukózy ústy u pěti subjektů se zhoršenou tolerancí ke glukóze (IGT ●) a u pěti subjektů s neinzulin dependentní diabetes mellitus (NIDDM). Obrázek 1A ukazuje významnou glukózovou odezvu. Obrázek 1B ukazuje inzulinovou odpověď. Obrázek 1C ukazuje odezvu GLP-1.

Obrázek 2 ukazuje srovnání významných vylučovacích rychlostí inzulinu (ISR) a významných koncentrací glukózy v každém subjektu během infuze glukózy s infuzí salinického

roztoku (O) nebo infuzi GLP-1 (●). Obrázek 2A ukazuje srovnání subjektů s IGT. Obrázek 2B ukazuje srovnání subjektů s NIDDM.

Obrázek 3 ukazuje profil sekrece glukózy, rychlosti sekrece inzulinu (ISR) a koncentrace inzulinu u dvou subjektů s IGT, subjektů D01 a D02. Obrázky 3A a 3C ukazují odpovědi na infuzi salinického roztoku. Obrázky 3B a 3D znázorňují odpovědi na infuzi s GLP-1.

Obrázek 4 znázorňuje srovnání hladin glukózy, rychlosti vylučování inzulinu (ISR) a hladin inzulinu u dvou subjektů s NIDDM, subjektů D07 a D09. Obrázky 4A a 4C ukazují profily během infuze salinického roztoku. Obrázky 4B a 4D znázorňují profily během infuze obsahující GLP-1.

Obrázek 5 znázorňuje srovnání spektrálních analýz vylučování inzulinu u subjektůh během infuzí salinického roztoku a GLP-1. Výsledky znázorněné na levé straně spektrální analýzy jsou subjekty s IGT. Výsledky ukázané na pravé straně spektrální analýzy jsou subjekty s NIDDM.

Obrázek 6 poskytuje srovnání normalizované síly spekter během infuze salinického roztoku a během infuze GLP. Obrázek 6A ukazuje srovnání normalizované spektrální síly během infuze salinického roztoku a během infuze GLP-1 u subjektů s IGT (D02). Obrázek 6B ukazuje srovnání normalizované spektrální síly během infuze salinického roztoku a infuze obsahující GLP-1 u subjektů s NIDDM (D07).

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady dále ilustrují aspekty předloženého vynálezu. Nicméně tyto příklady nemají být v žádném případě brány jako omezení myšlenek a zjištění předkládaného vynálezu na omezení daná příklady, pokud jde o rozsah.

Studie zde popsané byly prováděny na 10 subjektech, které byly rozděleny do dvou skupin na základě odezvy jejich plazmatické glukózy na test tolerance ke glukóze podané ústy (oral glucose tolerance test) při použití

kritérií Světové zdravotnické organizace (21) pro definování stupně intolerance ke glukóze. Pět subjektů mělo IGT a pět NIDDM. Pohlaví, věk, index tělesné hmotnosti (BMI), základní (bazální) hladiny glukózy na lačno, dvouhodinová glukóza, inzulin na lačno a HBA1c pro každý subjekt jsou uvedeny v tabulce 2. Subjekty s diabetes byly starší než subjekty s IGT, ale skupiny byly vyrovnané co se týče BMI. Průměrné hladiny glukózy na lačno a koncentrace glykosylovaného hemoglobinu byly ve skupině s IGT nižší ve srovnání se skupinou s NIDDM. Hladiny inzulinu na lačno se mezi oběma skupinami nelišily.

Tabulka 2

Základní klinické parametry subjektů s IGT a NIDDM

id. ozn.	pohlaví	věk	BMI	gluk. na lačno (mM)	2 h gluk. (mM)	inz.na lačno (pmol/l)	glyko hemo-glob.
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
prům.		47,8	30,7 ±	5,92	9,98	67,3	6,04
±s.o.		±1,7	2,2	±0,07	±0,37	±10,0	±015
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
prům.		58,6	28,1	7,71	14,83	44,5	7,12
±s.o.		±2,5	±1,7	±0,39	±1,29	±10,0	±0,39
hodn. P		P< 0,009	P= 0,36	P < 0,002	P < 0,007	P = 0,15	P < 0,04

		0,009		0,002	0,007		0,04
--	--	-------	--	-------	-------	--	------

Hladiny glukózy v plazmě byly měřeny metodou využívající glukóza oxidázu (YSI, 1500 G, Schlag Company, Bergish-Gladbach, Německo). Koeficient variace této metody byl <2%. Inzulin v plazmě byl měřen s použitím Abbottovy mikročasticové enzymové imunoanalýzy. Průměrný koeficient variace uvnitř hodnocení byl 5 %. C-peptid v plazmě byl měřen jak již bylo popsáno 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. Dolní limit citlivosti stanovení byl 0,02 pmol/ml a koeficient variace uvnitř stanovení v průměru 6 %. Glukagon byl měřen pomocí komerčně dostupného kitu pro radioimunoanalýzu (Biermann, Bad Nauheim, Německo) a koeficient variace uvnitř stanovení byl v průměru 8 %. IR-GLP-1 byl měřen s pomocí specifické polyklonální protilátky GA 1178 (Affinity Research, Nottingham, UK) (23). Ta vykazovala 100% reaktivitu s GLP-1 (1-36) amid a se zkráceným GLP-1 (7-36) amid. Imunoreaktivní materiál podobný GLP-1 byl odstraněn ze vzorků plazmy na náplních C-18 s využitím acetonitrilu pro eluci vzorků. Detekční limit stanovení byl 2 fmol/tuba. Antisérum nevykazovalo křížové reakce s GIP, pankreatickým glukagonem, glicentinem, oxyntomodulinem nebo GLP-2. Koeficienty variace uvnitř a mezi stanoveními činily 3,4 %, resp. 10,4 %.

Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (směrodatná odchylka, s.o.). Analýza dat byla prováděna s použitím statistického analytického systému (SAS Version 6 Edition, for Personal Computers, SAS Institute, Inc., Cary, NC). Význam rozdílů uvnitř jednotlivých indukcí pomocí infuze GLP-1 byl stanoven s použitím párových t testů. Rozdíly byly považovány za významné pokud bylo $P < 0,05$.

Byly použity standardní kinetické parametry pro odstranění (clearance) C-peptidu upravené pro věk, pohlaví

a povrch těla (24), Van Cauter E, Mestrez F, Sturis J, Polonsky KS. Odhad rychlosti vylučování inzulínu z hladin C-peptidu: srovnání individuálních a standardních kinetických parametrů pro odstranění C-peptidu: *Diabetes* 41:368-377, 1992. Tyto parametry byly použity pro odvození ISR z koncentrací C-peptidu v plazmě pomocí dekonvoluce, jak již bylo popsáno v (25,26), v 15 minutových intervalech, což odpovídalo intervalům mezi odběry vzorků krve.

Subjekty s diabetes byly léčeny pouze dietou s výjimkou subjektu D07, který byl dříve léčen ústně podávaným hypoglykemickým přípravkem, jehož podávání bylo přerušeno 4 týdny před studií. Žádnému z diabetických pacientů nebyl nikdy podán inzulín. U všech subjektů byla dva týdny před studií zahájena dieta na udržení hmotnosti obsahující přinejmenším 200 g karbohydrátů denně.

Každý subjekt byl sledován ve třech oddělených případech. Všechny studie byly prováděny po 12 hodin trvajícím hladovění přes noc začínajícím v 0700, pokud není uvedeno jinak, v případě ležících subjektů. Na každé předloktí byl umístěn intravenózní katetr, jeden pro odebírání vzorků krve a druhý pro podávání glukózy a GLP-1 podle potřeby. Při všech experimentech byla ruka se vzorkovacím katetrem udržována ve vyhřívané přikrývce, aby se zajistila arterializace žilní krve. V následujících příkladech byl GLP-1 podáván subjektům ve formě GLP-1 (7-36) amid.

Příklad 2 (Test na toleranci k ústně podávané glukóze)

Byly odebírány vzorky krve pro měření glukózy, C-peptidu, inzulínu, glukagonu a GLP-1 v 30 minutových intervalech po dobu 120 minut, potom co bylo podáno 75 mg glukózy (Boehringer Mannheim, Mannheim, Německo). Byly vypočteny změny ploch pod křivkou (AUC) od 0 do 120 minut glukózu, C-peptid, glukagon a GLP-1. Koncentrace glukózy byly použity pro definování stupně intolerance ke glukóze podle kritérií světové zdravotnické organizace (WHO).

Odezva skupiny s IGT a s NIDDM na ústně podanou glukózu je shrnuta v tabulce 3.

Odezvy glukózy, inzulinu a GLP-1 u subjektů po podání 75 mg glukózy ukazuje obrázek 1. Hodnota AUC pro glukózu od 0 do 120 minut byla nižší ve skupině s IGT, ale AUC pro inzulin, C-peptid, glukagon a GLP-1 se nelišily.

Tabulka 3

Odezva na glukózu podanou ústy

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

P<0,05 pro IGT vs NIDDM

Když byly průměry ISR vyneseny proti průměrným hladinám glukózy, bylo pozorováno, že GLP-1 způsobuje významné snížení hladin glukózy bez významnějších změn průměrů rychlostí vylučování inzulinu (obrázek 2).

Příklad 3 (podávání oscilující glukóзовé infuze)

Periferální podávání glukózy v oscilujícím módu způsobilo pravidelné oscilace glukózy v plazmě. V normálních subjektech jsou β -buňky schopné detekovat a odpovídat na opakované zvyšování a snižování koncentrace glukózy souběžnými změnami vylučování inzulinu. Toto upravení oscilací vylučování inzulinu v závislosti na

oscilacích glukózy se nazývá "vyškolení" (entrainment). Nedostatek vyškolení na glukózu je projevem dysfunkce β -buněk u osob s IGT a mírným NIDDM.

Použili jsme protokol nízké dávkové oscilující glukózové infuze, protože je to velmi citlivý test schopnosti β -buněk vnímat a odpovídat na malé změny koncentrací plazmatické glukózy. Tento test zkouší integritu zpětnovazebné smyčky spojující glukózu a vylučování inzulínu. Normální odpověď vyžaduje neporušenou schopnost vnímat glukózu.

Aby se určilo, zda byly β -buňky schopné detekovat oscilace glukózy a odpovídat na ně, byla infuze glukózy prováděna v oscilačním módu s malým objemem salinického roztoku po dobu 12 hodin. Amplituda podávaných oscilací byla 33 % nad a pod průměrnou hodnotu 4 mg/kg/min a jejich periodičita činila 144 minut.

Aby se stanovil účinek GLP-1 na schopnost β -buněk odpovídat na oscilace glukózy, byla infuze glukózy prováděna stejným způsobem a GLP-1 bylo infuzováno konstantní rychlostí 0,4 pmol/kg/min po celých 12 hodin. Každá studie se skládala z počáteční dvouhodinové periody (0700-0900), aby mohlo být dosaženo ustáleného stavu. Potom bylo pokračováno následnou periodou trvající 10 hodin (0900-1900), během které byly v 15 minutových intervalech odebírány vzorky krve pro stanovení glukózy, inzulínu, C-peptidu a glukagonu a v 60 minutových intervalech pro stanovení GLP-1.

Průměrné hladiny glukózy byly významně nižší v obou skupinách při infuzi GLP-1 ve srovnání s infuzí soli, s průměrným poklesem $2,4 \pm 0,6$ mM u subjektů s IGT ($P < 0,02$) a $5,2 \pm 0,5$ mM u diabetiků ($P < 0,0005$). Navzdory významnému snížení koncentrace plazmatické glukózy, nebyly u obou skupin průměry ISR významně odlišné během infuze GLP-1 ve srovnání s infuzí salinického roztoku (tabulka 4).

Tabulka 4

Průměrné odezvy glukózy a ISR na 12 hodinovou infuzi soli nebo GLP-1

id. označ.	prům.gluk. 12 h inf. salin.	prům.gluk. 12 h inf. GLP-1	prům. ISR 12 h inf. salin.	prům. 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
průměr	8,79	6,35	572,1	654,2
±s.o.	±0,56	±0,08	±116,1	±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
průměr	14.59	9.40	440.2	508
±s.o.	±1.3	± 0.9*	±80.1	±53.4

* $P < 0,05$, podle párového t testu, odkazuje ke srovnání mezi infuzí salinického roztoku a GLP-1.

Průměrné hladiny inzulinu během infuze GLP-1 ve srovnání s infuzí salinického roztoku byly také zachovány; zvýšily se o 102 ± 90 pmol/l s $P=0,32$ u subjektů s IGT a o 7 ± 12 pmol/L s $P=0,56$ u subjektů s NIDDM. Průměrné hladiny glukagonu se také nelišily během infuze GLP-1 ve srovnání s infuzí salinického roztoku ($39,3 \pm 5,4$ pg/ml proti $39,4 \pm 5,9$ pg/ml; $P=0,94$) u subjektů s IGT ($46,4 \pm 3,2$ pg/ml proti $42,8 \pm 5,4$ pg/ml; $P=0,4$) u subjektů s NIDDM. Hladiny GLP-1

dosažené během infuze GLP-1 byly $15,46 \pm 4,6$ pmol/l ve srovnání s $2,0 \pm 0,8$ pmol/l během infuze salinického roztoku. ($P < 0,001$). Tyto úrovně odpovídají postprandiálním fyziologickým hladinám.

Příklad 4 (vztah mezi glukózou a ISR u jednotlivých subjektů s IGT)

V normálních subjektech je každý puls (náhlá změna koncentrace) glukózy úzce spojen s pulsem ISR (odpověď sekrecí inzulínu). Jak již bylo ukázáno, je toto spojení u subjektů s IGT poškozeno. Profily glukózy a ISR během oscilující glukózové infuze salinického roztoku jsou od jednoho reprezentativního subjektu s IGT, D02 ukázány v obrázku 3A a 3C. Tyto výsledky demonstrují, že u subjektů s IGT se během infuze salinického roztoku ztrácí úzké spojení mezi glukózou a ISR a dochází k mnoha oscilacím v ISR, které nezávisí na glukóze. V přítomnosti fyziologických postprandiálních hladin GLP-1 (obrázky 3B a 3D) je model odpovědi vylučováním inzulínu na glukózu zlepšen u subjektů s IGT tak, že každý puls glukózy je následován pulsem v ISR. Tak GLP-1 zlepšuje schopnost β -buněk reagovat na exogenní infuzi glukózy u subjektů s IGT.

Příklad 5 (Vztah mezi glukózou a ISR u jednotlivých subjektů s NIDDM)

Obrázek 4 ukazuje profily glukózy i ISR jednoho subjektu s NIDDM, D07. Ve zřetelném protikladu k subjektům s IGT, navzdory snížení koncentrací plazmatické glukózy a zachování ISR nebyl během infuze GLP-1 zlepšen model odpovědi sekrecí inzulínu na glukózu (obrázky 4B a 4D) s mnoha přetrvávajícími oscilacemi ISR nezávislými na glukóze. Profily glukózy a ISR během oscilující glukózové infuze salinického roztoku ukazují obrázky 4A a 4C.

Příklad 6 (efekt GLP-1 na spektrální sílu v IGT a NIDDM)

Aby se zjistilo, zda byla u jednotlivých subjektů pomocí glukózy "nacvičena" sekrece inzulínu, byly aktuální profily sekrece inzulínu analyzovány spektrální analýzou. Analýza spektrální síly byla použita k hodnocení přítomnosti úzké vazby mezi oscilacemi koncentrací glukózy a oscilacemi v ISR. Tato metoda hodnotí pravidelnost oscilací sekrece inzulínu při předem stanovené frekvenci. Spektrální píky odpovídají dominantní periodicitě a výšky píků odpovídají spektrální síle. Každé spektrum bylo normalizováno s předpokladem, že totální variance každé série je 100 % a bylo vyjádřeno jako normalizovaná spektrální síla.

Průměrná normalizovaná spektrální síla pro glukózu u subjektů s IGT činila $11,2 \pm 1,5$ během infuze salinického roztoku a $13,2 \pm 1,6$ během infuze s GLP-1 ($P=0,19$) a u subjektů s NIDDM $6,5 \pm 1,8$ během infuze salinického roztoku a $9,8 \pm 0,7$ během infuze s GLP-1 ($P=0,18$). Obrázek 5 jasně demonstruje, že infuze GLP-1 u subjektů s IGT zlepšila odpovědi sekrecí inzulínu na oscilace plazmatické glukózy, což vedlo k většímu stupni "nacvičení" sekrece inzulínu v odpovědi na glukózu. Tento účinek byl kvantifikován srovnáním normalizované spektrální síly profilů vylučování inzulínu. Spektrální síla pro ISR se zvýšila z $2,9 \pm 1,4$ během solné infuze na $8,9 \pm 1,7$ během infuze GLP-1; ($P<0,006$) a nebyla změněna u subjektů s NIDDM ($1,1 \pm 0,5$ na $1,5 \pm 0,8$; $P=0,6$).

Spektrální analýza oscilujících glukózových profilů potvrdila existenci píků v spektru plazmatické glukózy ve 144 minutách odpovídajících periodě exogenní glukózy infuze. Jednotlivé spektrální síly pro glukózu a ISR v jednom subjektu s IGT (obrázek 6A) a v jednom subjektu s NIDDM (obrázek 6B) během solné infuze a během infuze GLP-1 jsou ukázány v obrázku 6. Tato data odpovídají datům, která ukazují obrázky 3C a 3D a obrázky 4A a 4B. Spektrální síla

se zvýšila z 0,6 na 8,9 u subjektu s IGT a byla minimálně změněna z 0,28 na 1,51 u subjektu s NIDDM. Píky se ve spektru plazmatické glukózy objevily ve 144 minutách. Během solné infuze se dominantní spektrální pík pro ISR nevyskytoval ve 144 minutách, ale spíše byl v 0,2. spektrální síla s infuzí GLP-1 činila 1,5.

Během infuze salinického roztoku bylo špatné "vycvičení" (obr. 3A), čemuž odpovídá, že spektrální síla pro ISR ve 144 činila 0,6. Během infuze GLP-1 (obr. 3B) se periodicitu dominantního spektrálního píku v ISR vyskytovala ve 144 minutách, což demonstruje, že GLP-1 způsobilo vycvičení β -buněk v tomto subjektu.

Průměrná hodnota normalizované spektrální síly v kontrolních subjektech (index tělesné hmotnosti tj. BMI 28,3) s normální tolerancí ke glukóze činila $7,2 \pm 0,6(9)$.

Výsledky této studie ukázaly, že kontinuální infuze fyziologických postprandiálních hladin GLP-1 redukovaly koncentrace plazmatické glukózy a stimulovaly sekreci inzulinu u subjektů s IGT a NIDDM. Nejdůležitější je, že GLP-1 obnovil schopnost β -buněk vnímat a odpovídat na plazmatickou glukózu ve všech subjektech s IGT (kvantifikováno normalizovanou spektrální silou), s měnící se odpovědí u subjektů s již rozvinutým stavem NIDDM.

Možný mechanismus, kterým je u β -buněk zlepšena funkce pomocí GLP-1 zahrnuje regulaci prvků citlivých ke glukóze, eliminace glukotoxicity a zlepšení inzulinové rezistence. GLP-1 a glukóza uplatňují synergickou inzulinotropní akci na β -buňkách zahrnující stimulaci tvorby cyklického AMP, vylučování inzulinu, biosyntézu inzulinu a expresi genu kódujícího proinzulin.

Tyto příklady ukazují, že kontinuální infuze fyziologických hladin GLP-1 snižují koncentrace plazmatické glukózy a stimuluje vylučování inzulinu u subjektů s IGT a NIDDM. Nejdůležitější je, že GLP-1 obnovuje schopnost β -buněk vnímat a odpovídat na malé změny koncentrací plazmatické glukózy u subjektů s IGT a jen s proměnlivou

odezvou u subjektů s NIDDM. U subjektů s IGT jsme pozorovali významné zvýšení spektrální síly měření funkce β -buněk, které nezáviselo na nastavení pro změny citlivosti k inzulinu.

SEZNAM SEKVENČÍ

<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

<130> P03986W00

<140> PCT/US99/10040

<141> 1999-05-07

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> savčí

<400> 1

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

1

5

10

15

26

120001

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> savčí

<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> savčí

<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> savčí

<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> savčí

<400> 5

28

12.02.01

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> savčí

<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

12.02.01

39

<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

1. Kompozice, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje sloučeninu, která se váže na receptor pro "GLP-1", a farmaceutický nosič, přičemž je uvedena sloučenina přítomna v množství efektivním pro zvýšení citlivosti a odpovědi pankreatických β -buněk na změny v plazmatické glukóze, měřeno časováním a sekrecí inzulínu v odpovědi na zvýšenou plazmatickou glukózu u člověka se zhoršenou tolerancí ke glukóze.

2. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že sloučenina vážící se na receptor je zvolena jako (a) peptid, který zahrnuje aminokyselinovou sekvenci glukagonu podobného peptidu-1, nebo (b) variantní peptid zahrnující aminokyselinovou sekvenci, která se liší od sekvence glukagonu podobného peptidu-1 jednou nebo více substitucemi, delecemi nebo inzercemi.

3. Kompozice podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je glukagonu podobný peptid-1.

4. Kompozice podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je glukagonu podobný peptid-1 (7-37), který má sekvenci 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. Kompozice podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je glukagonu podobný peptid-1 (7-36) amid, který má sekvenci 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. Kompozice podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je variantní peptid, v kterém se kombinace substitucí, delecí a inzercí v sekvenci aminokyselin neliší více než 10 aminokyselinami od aminokyselinové sekvence glukagonu podobného peptidu-1.

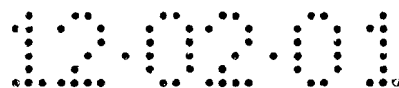
7. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále zahrnuje činidlo, které zvyšuje poločas životnosti sloučeniny *in vivo*.

8. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je exprimována polynukleotidem.

9. Kompozice podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je organická molekula, jejíž molekulová hmotnost nepřesahuje asi 5000.

10. Způsob léčení jedince se zhoršenou tolerancí ke glukóze, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje podávání kompozice zahrnující sloučeninu vážící se na receptor pro glukagonu podobný peptid-1 a farmaceutický nosič uvedenému jedinci, kde uvedená kompozice obsahuje množství uvedené sloučeniny efektivní pro zvýšení pravidelnosti inzulínových odpovědí a jejich amplitudy v reakci na změny v plazmatické glukóze.

11. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina vybrána jako (a) peptid, který zahrnuje aminokyselinovou sekvenci glukagonu podobného peptidu-1, nebo (b) variantní peptid zahrnující aminokyselinovou sekvenci, která se liší od sekvence glukagonu podobného peptidu-1 jednou nebo více substitucemi, delecemi nebo inzercemi.



12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je glukagonu podobný peptid-1.

13. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je glukagonu podobný peptid-1 (7-37), který má sekvenci 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. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je glukagonu podobný peptid-1 (7-36) amid, který má sekvenci 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. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je variantní peptid, v kterém se kombinace substitucí, delecí a inzercí v sekvenci aminokyselin neliší více než 10 aminokyselinami od aminokyselinové sekvence glukagonu podobného peptidu-1.

16. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je exprimována polynukleotidem.

17. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je organická molekula, jejíž molekulová hmotnost nepřesahuje asi 5000.

18. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že krok podávání je vybrán ze skupiny sestávající ze způsobů: intravenózního, podkožního, vnitrosvalového, interperitoneálního, injekční dávky s dlouhotrvajícím uvolňováním, hlubokým vdechnutím plícemi s

dlouhotrvajícím uvolňováním, ústního a podání pomocí náplasti.

19. Způsob podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m , že dále zahrnuje podávání činidla, které zvyšuje poločas životnosti *in vivo* uvedené receptor vážící sloučeniny.

20. Způsob podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedené činidlo je podáváno souběžně s kompozicí.

21. Způsob podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedené je činidlo kovalentně vázáno na receptor vážící sloučeninu.

22. Způsob podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nitrožilní podávání je v rozmezí dávky od asi 0,3 do asi 2,0 pmol/kg za minutu.

23. Způsob podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m , že kontinuální podkožní podávání je v rozmezí dávky od asi 1,0 do asi 20,0 pmol/kg za minutu.

24. Způsob léčení člověka se zhoršenou tolerancí ke glukóze, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje podávání kompozice obsahující sloučeninu, která se váže na receptor pro glukagonu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič, člověku, kde uvedená kompozice obsahuje množství uvedené sloučeniny efektivní pro zpomalení nebo zabránění ztrátě kontroly plazmatické glukózy a vzniku diabetes mellitus nezávisující na inzulinu.

25. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina vybrána jako (a) peptid, který zahrnuje aminokyselinovou sekvenci

glukagonu podobného peptidu-1, nebo (b) variantní peptid zahrnující aminokyselinovou sekvenci, která se liší od sekvence glukagonu podobného peptidu-1 jednou nebo více substitucemi, delecemi nebo inzercemi.

26. Způsob podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je glukagonu podobný peptid-1.

27. Způsob podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je glukagonu podobný peptid-1 (7-37), který má sekvenci 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. Způsob podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je glukagonu podobný peptid-1 (7-36) amid, který má sekvenci 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. Způsob podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je variantní peptid, v kterém se kombinace substitucí, delecí a inzercí v sekvenci aminokyselin neliší více než pěti aminokyselinami od aminokyselinové sekvence glukagonu podobného peptidu-1.

30. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m , že je receptor vážící sloučenina exprimována polynukleotidem.

31. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m , že receptor vážící sloučenina je organická molekula, jejíž molekulová hmotnost nepřesahuje asi 5000.

32. Způsob podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m , že krok podávání je vybrán ze skupiny sestávající ze způsobů: intravenózního, podkožního, vnitrosvalového, interperitoneálního, injekční dávky s dlouhotrvajícím uvolňováním, hlubokým vdechnutím plícemi s dlouhotrvajícím uvolňováním, ústního a podání pomocí náplasti.

33. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nitrožilní podávání je v rozmezí dávky od asi 0,1 do asi 10 pmol/kg za minutu.

34. Způsob podle nároku 32, v y z n a č u j í c í s e t í m , že kontinuální podávání pod kůži je v rozmezí dávky od asi 0,1 do asi 75,0 pmol/kg za minutu.

35. Způsob léčení jedince se zhoršenou tolerancí ke glukóze, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje podávání kompozice obsahující sloučeninu, která se váže na receptor pro glukagonu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič tomuto jedinci, kde uvedená kompozice obsahuje množství uvedené sloučeniny efektivní pro zlepšení "vyškolení" β -buněk, aby vylučovaly inzulin v odpovědích na exogenní oscilace glukózy.

36. Způsob léčení jedince se zhoršenou tolerancí ke glukóze, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje podávání kompozice obsahující sloučeninu, která se váže na receptor pro glukagonu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič tomuto jedinci, kde uvedená kompozice obsahuje množství uvedené sloučeniny efektivní pro zlepšení normalizace modelu vylučování inzulinu při zhoršené toleranci ke glukóze.

37. Způsob léčení jedince se zhoršenou tolerancí ke glukóze, v y z n a č u j í c í s e t í m , že

zahrnuje podávání kompozice obsahující sloučeninu, která se váže na receptor pro glukagonu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič tomuto jedinci, kde uvedená kompozice obsahuje množství uvedené sloučeniny efektivní pro snížení hladin inzulínu v plazmě u jedince se zhoršenou tolerancí ke glukóze.

38. Způsob léčení jedince se zhoršenou tolerancí ke glukóze, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje podávání kompozice obsahující sloučeninu, která se váže na receptor pro glukagonu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič tomuto jedinci, kde uvedená kompozice obsahuje množství uvedené sloučeniny efektivní pro snížení inzulínové rezistence u jedince se zhoršenou tolerancí ke glukóze.

39. Způsob léčení jedince se zhoršenou tolerancí ke glukóze, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje podávání kompozice obsahující sloučeninu, která se váže na receptor pro glukagonu podobný peptid-1, a farmaceutický nosič tomuto jedinci, kde uvedená kompozice obsahuje množství uvedené sloučeniny efektivní pro zlepšení pravidelnosti inzulínových odpovědí a jejich amplitudy v reakci na změny v plazmatické glukóze a pro redukci hladin inzulínu v plazmě.

40. Způsob léčení jedince, jehož symptomy indikují zvýšené riziko mozkové cévní příhody, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje podávání kompozice obsahující sloučeninu, která se váže na receptor pro glukagonu podobný peptid-, a farmaceutický nosič tomuto jedinci, kde uvedená kompozice obsahuje množství uvedené sloučeniny efektivní pro zlepšení pravidelnosti inzulínových odpovědí a jejich amplitudy v reakci na změny v plazmatické glukóze a pro redukci hladin inzulínu v plazmě.

2000-4614

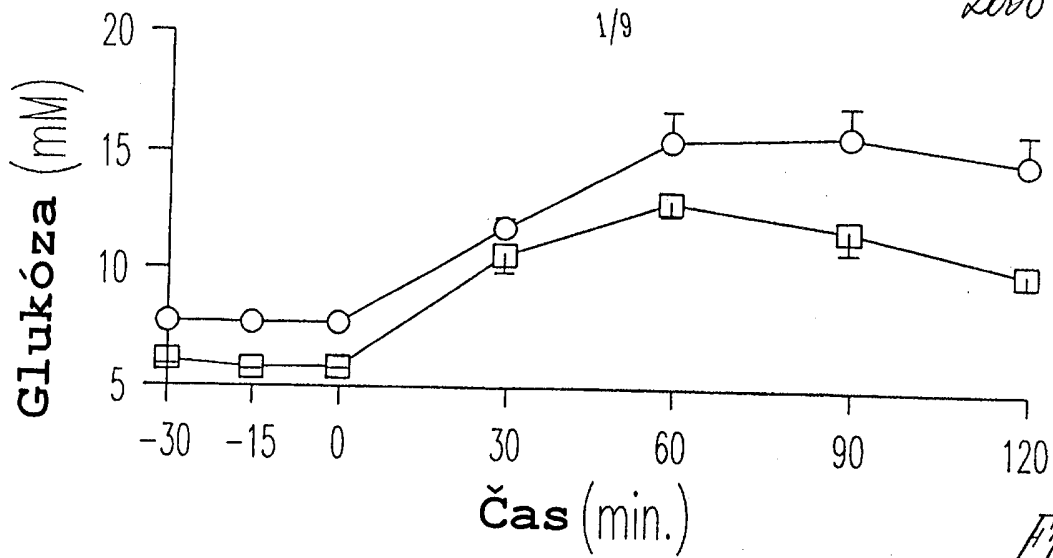


Fig. 1A

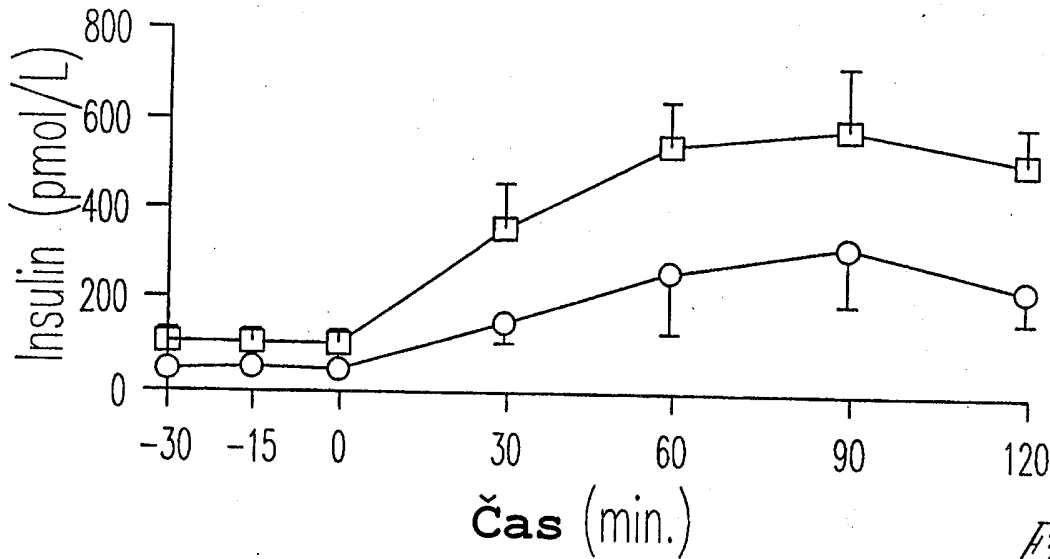


Fig. 1B

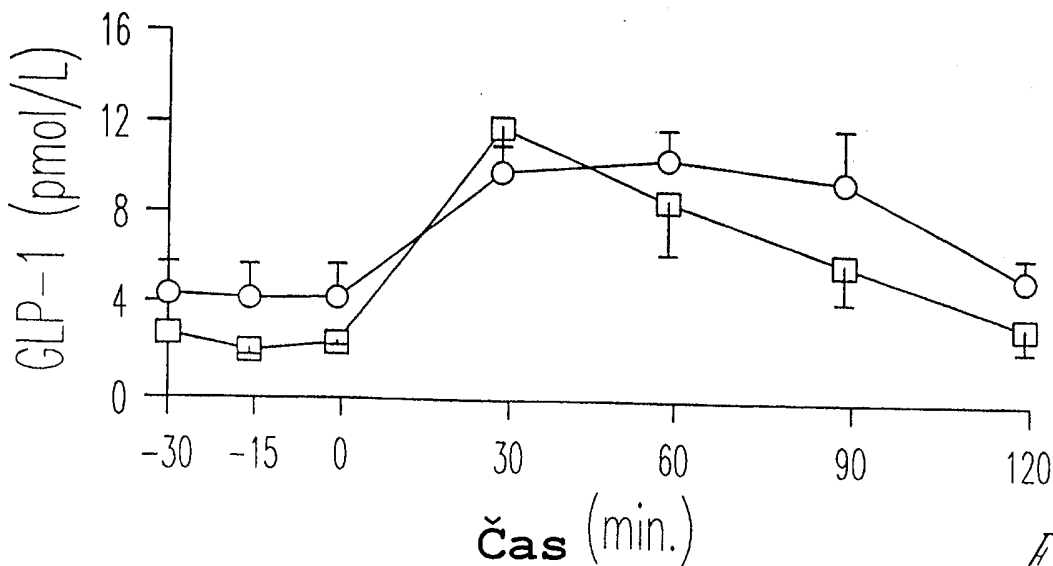


Fig. 1C

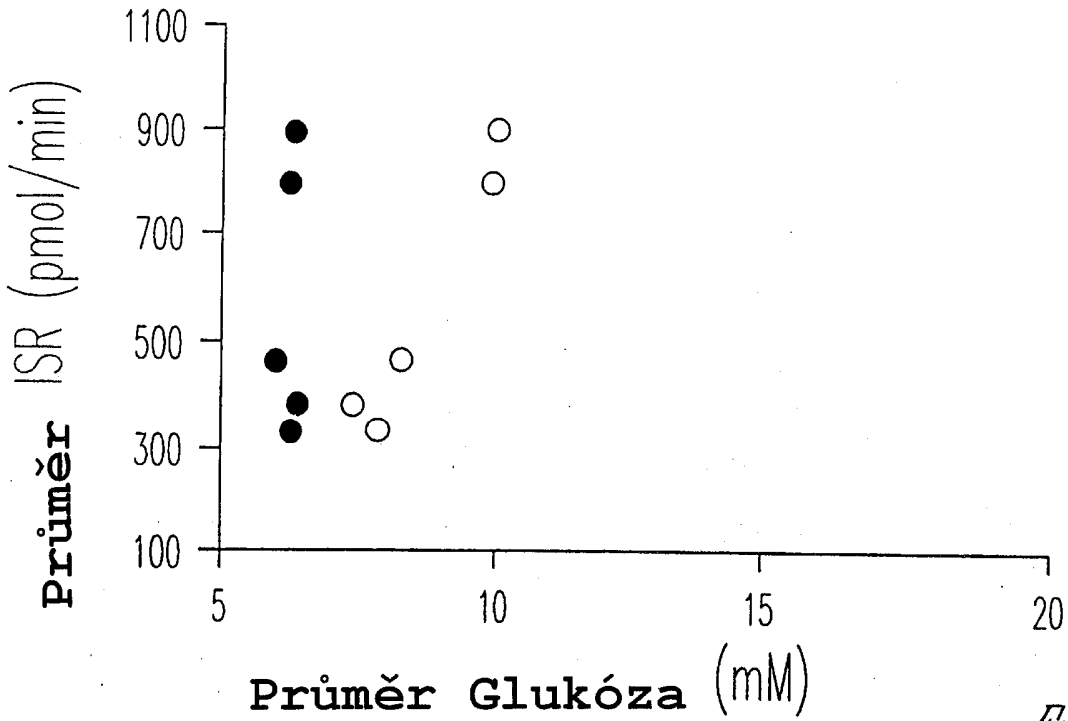


Fig. 2A

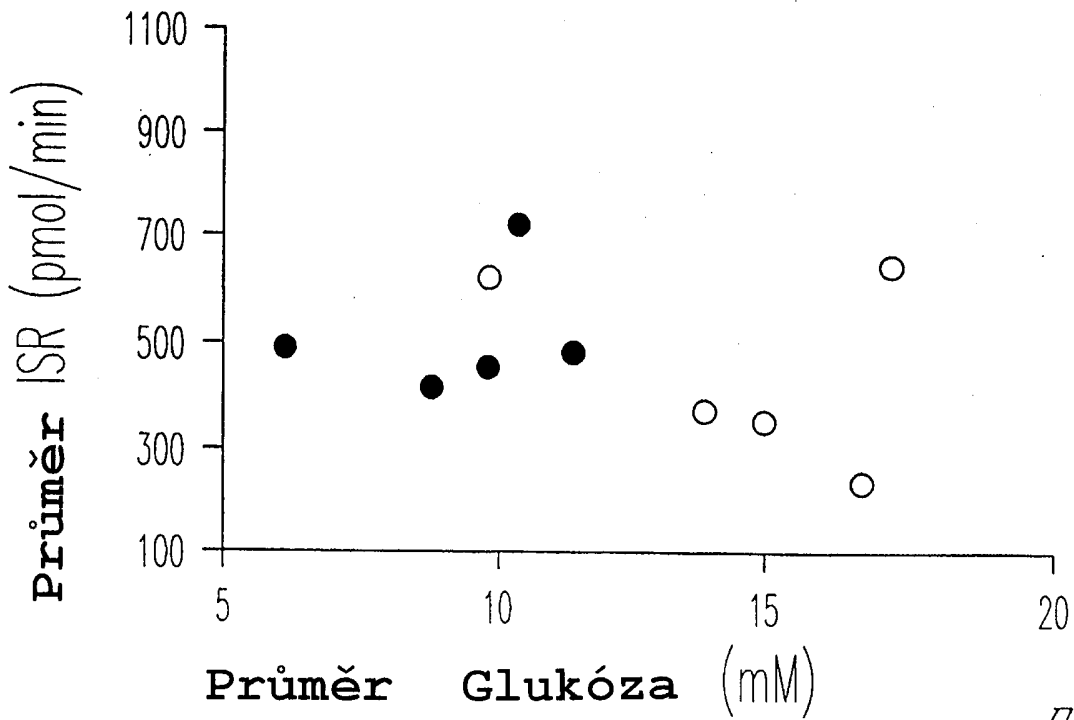


Fig. 2B

12.02.01

WO 99/64061

PCT/US99/10040

2000-4614

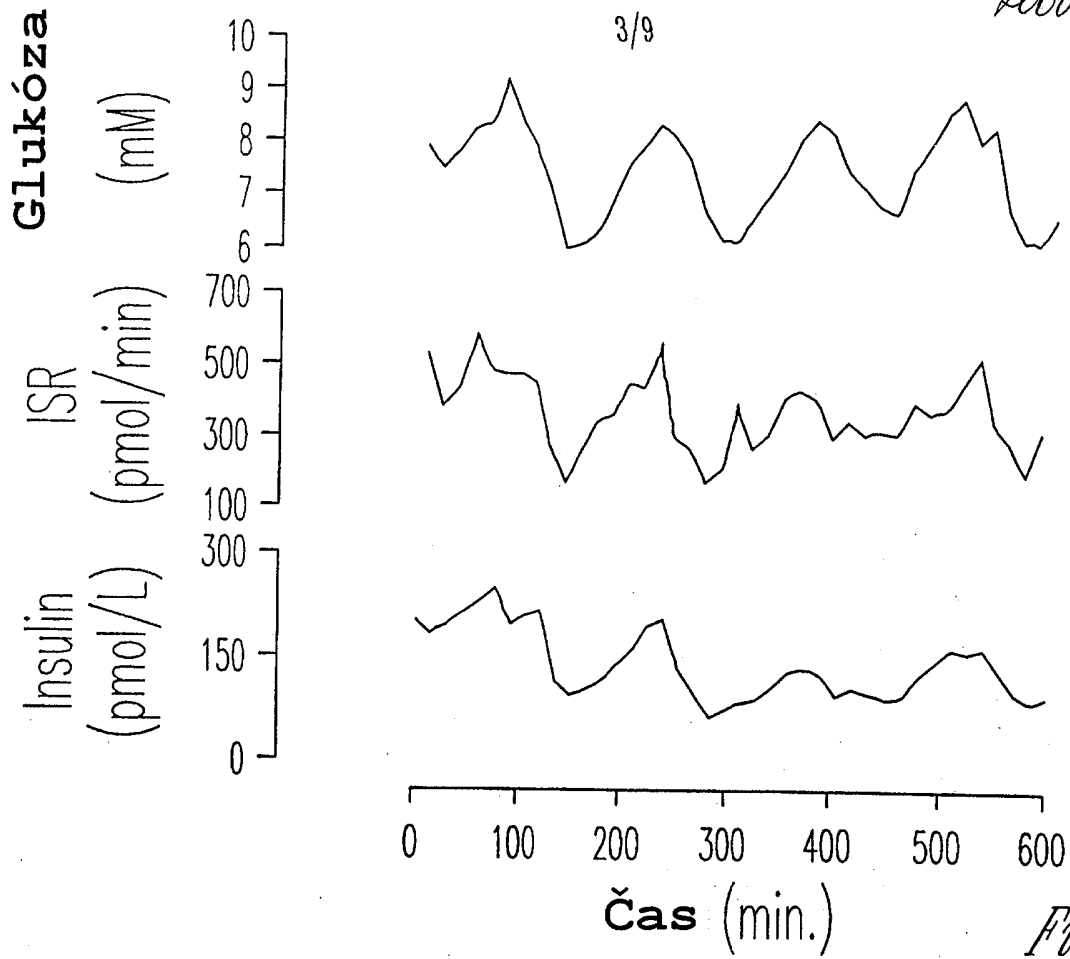


Fig. 3A

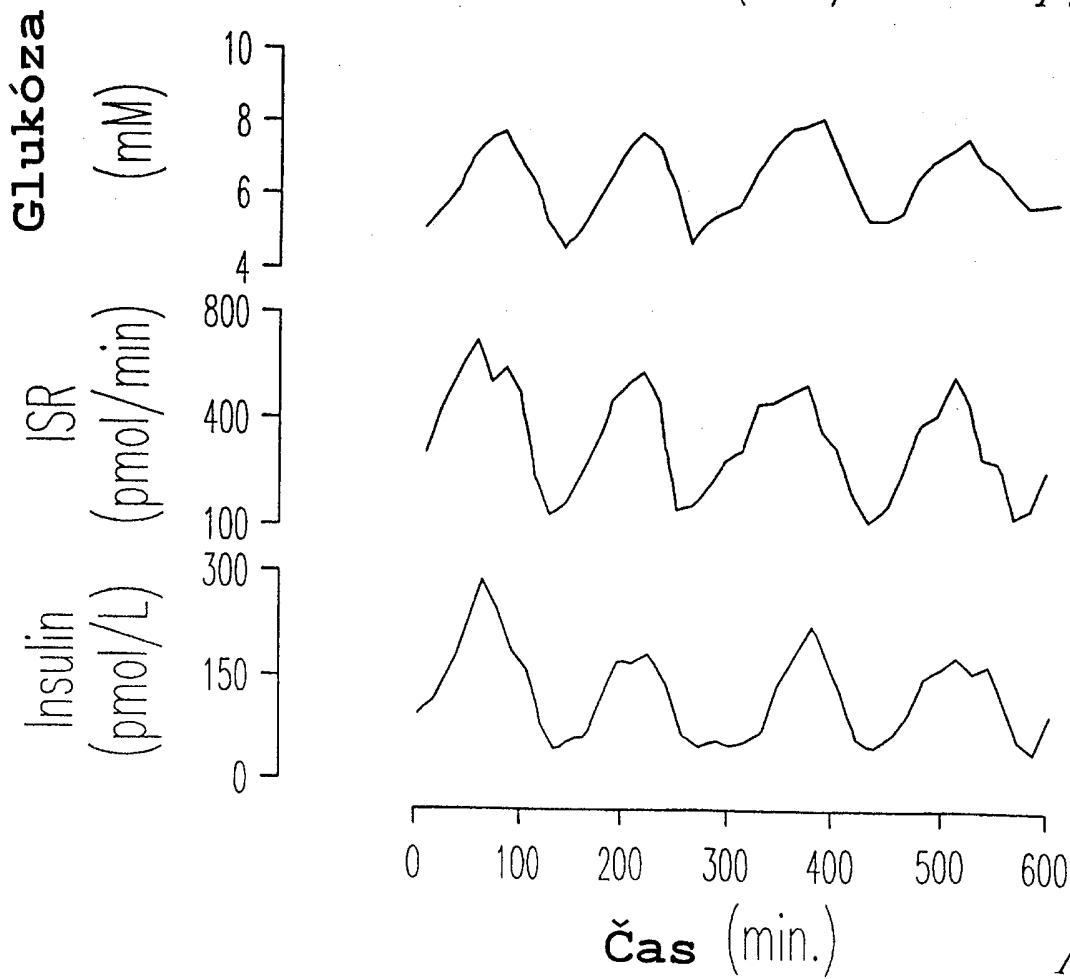


Fig. 3B

12:02:01

WO 99/64061

PCT/US99/10040

2000-4614

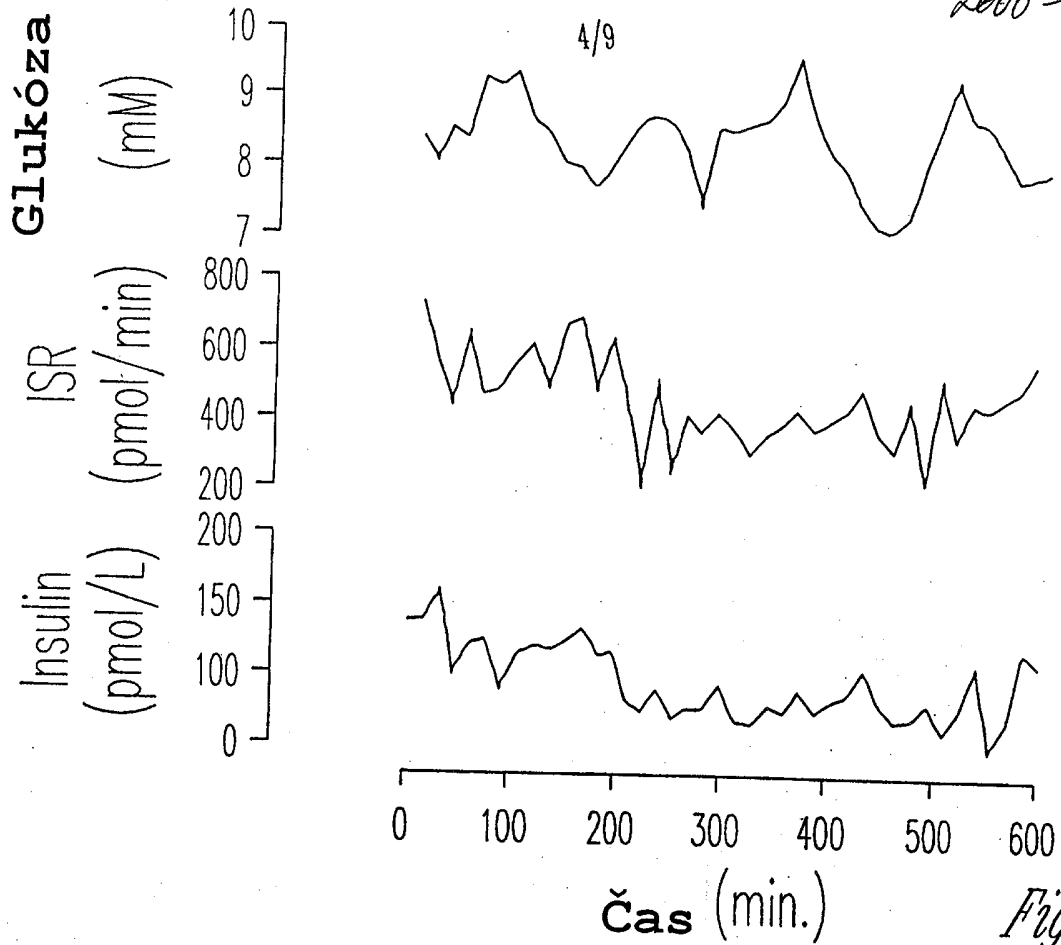


Fig. 3C

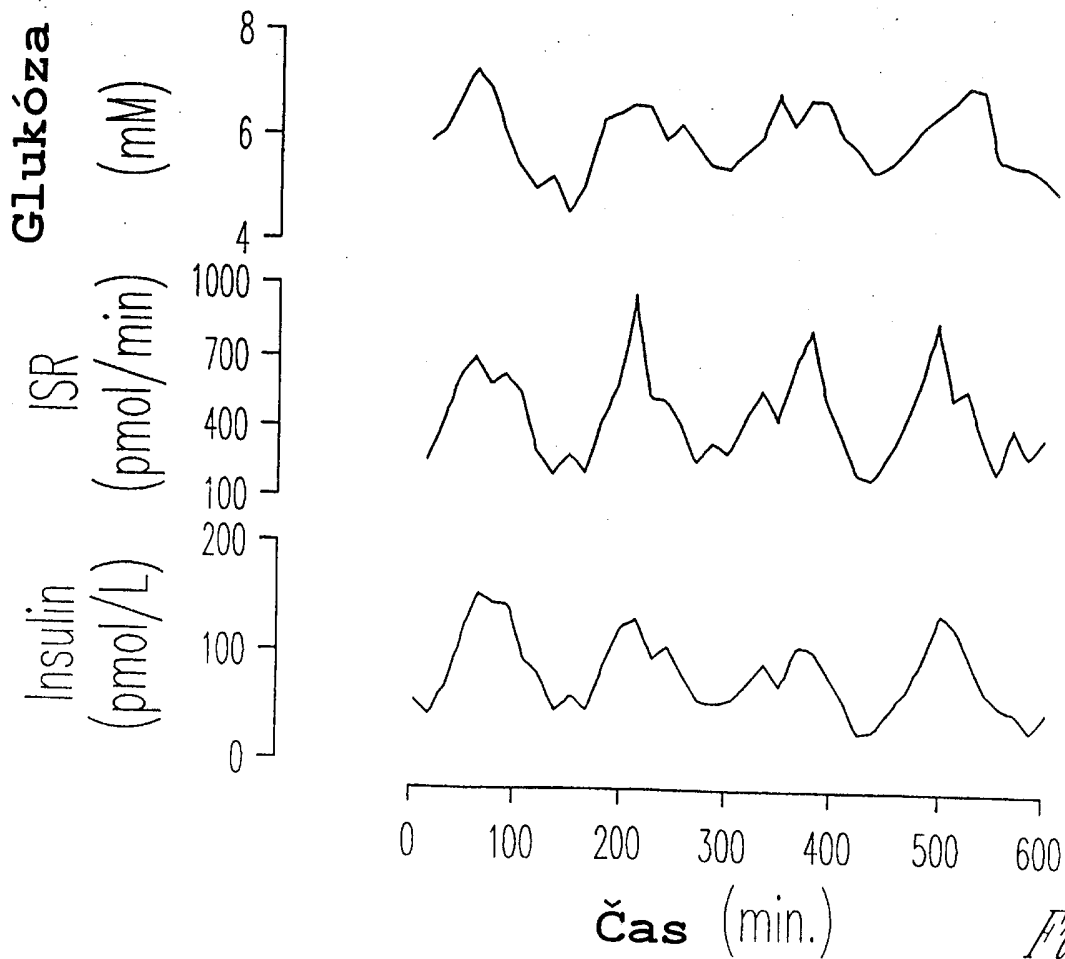


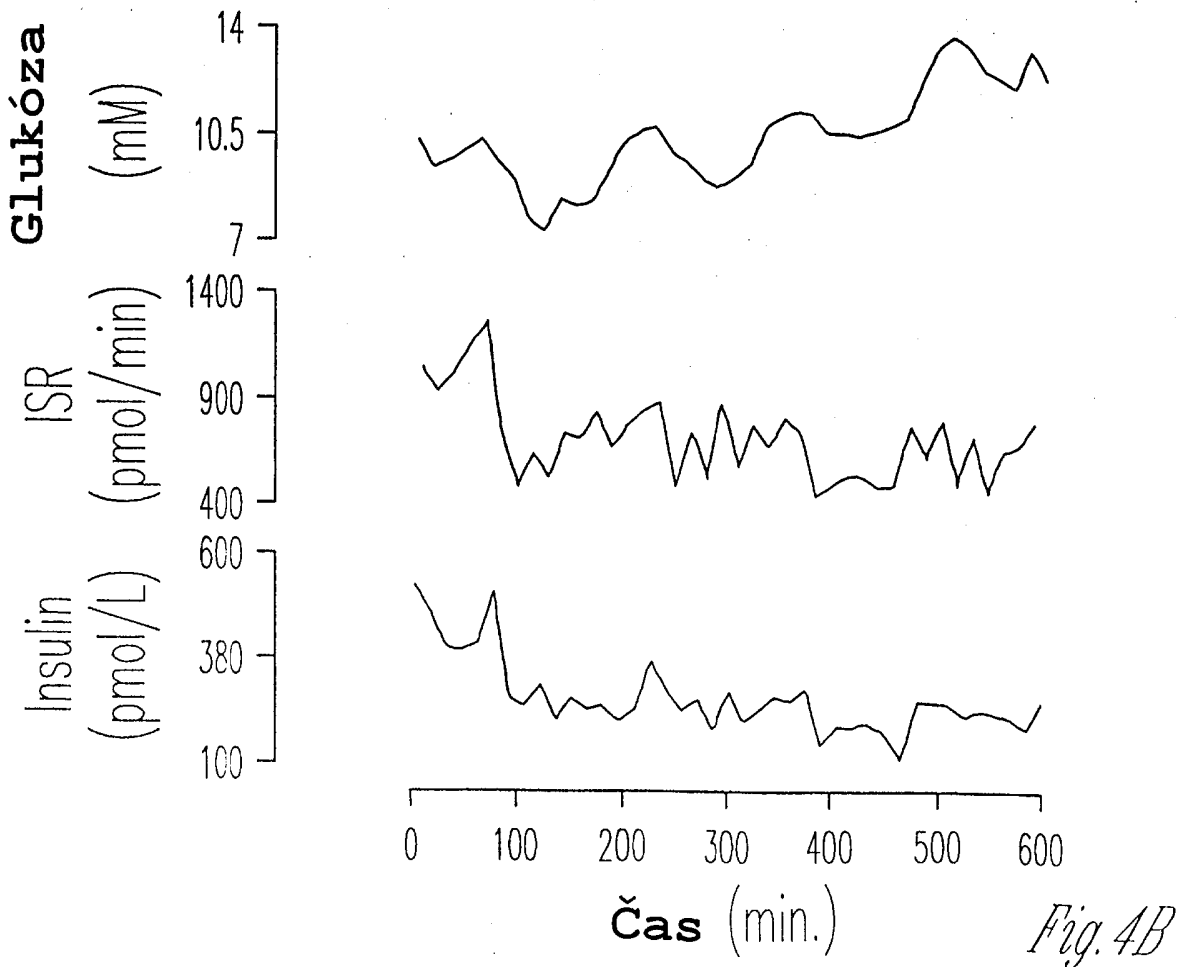
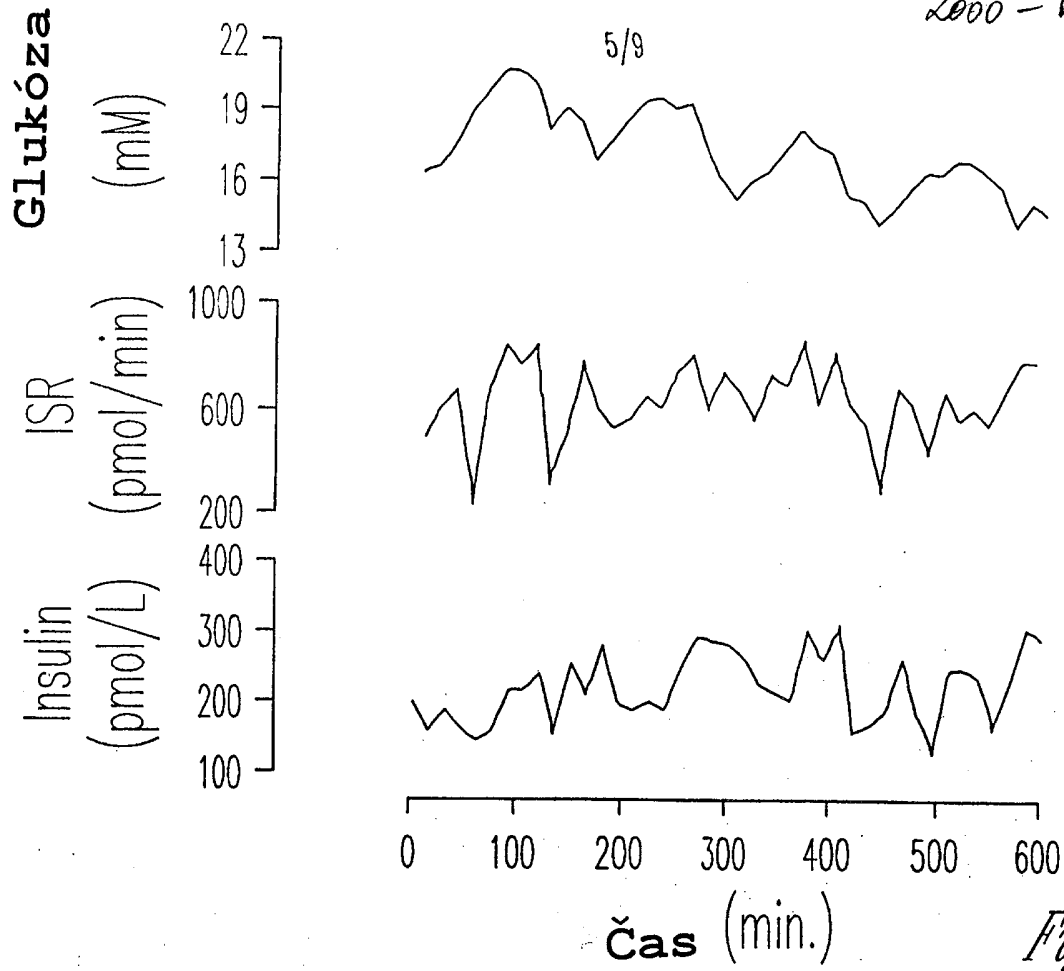
Fig. 3D

12.02.01

WO 99/64061

PCT/US99/10040

2000-4614

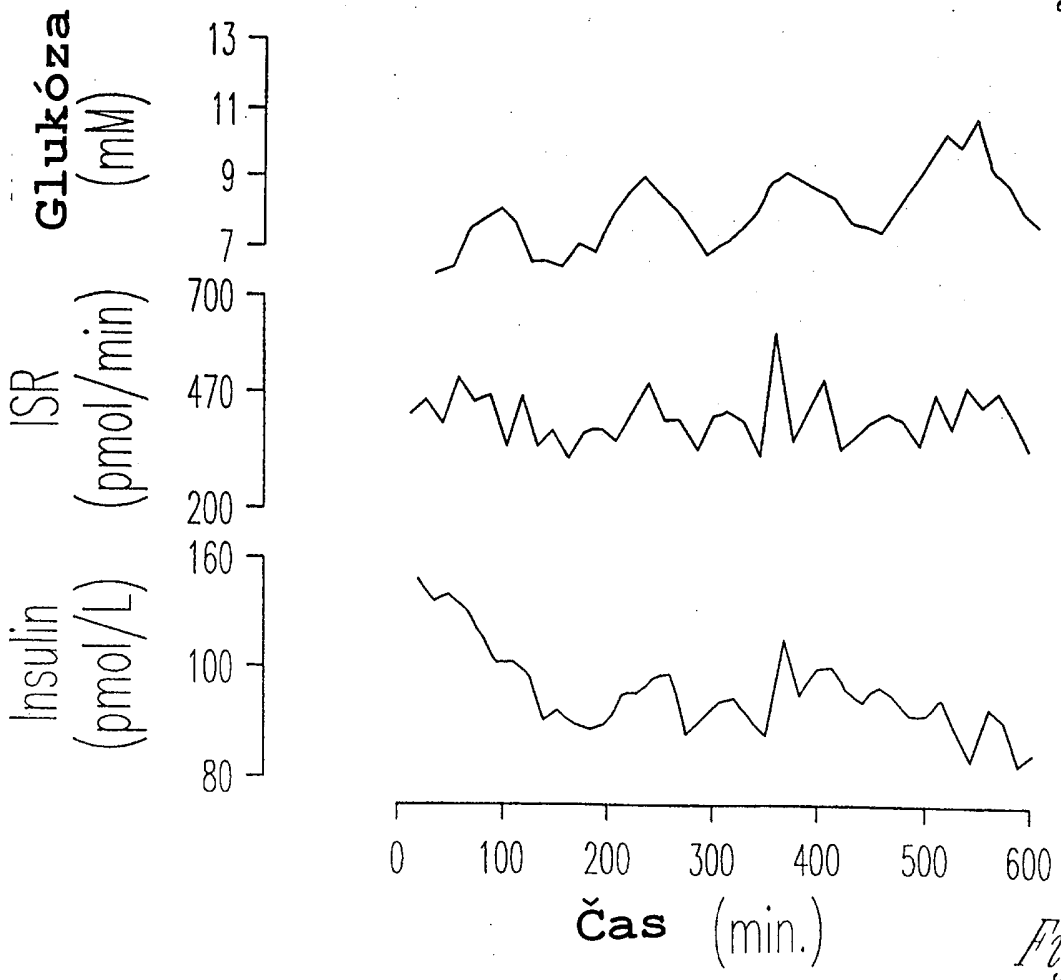
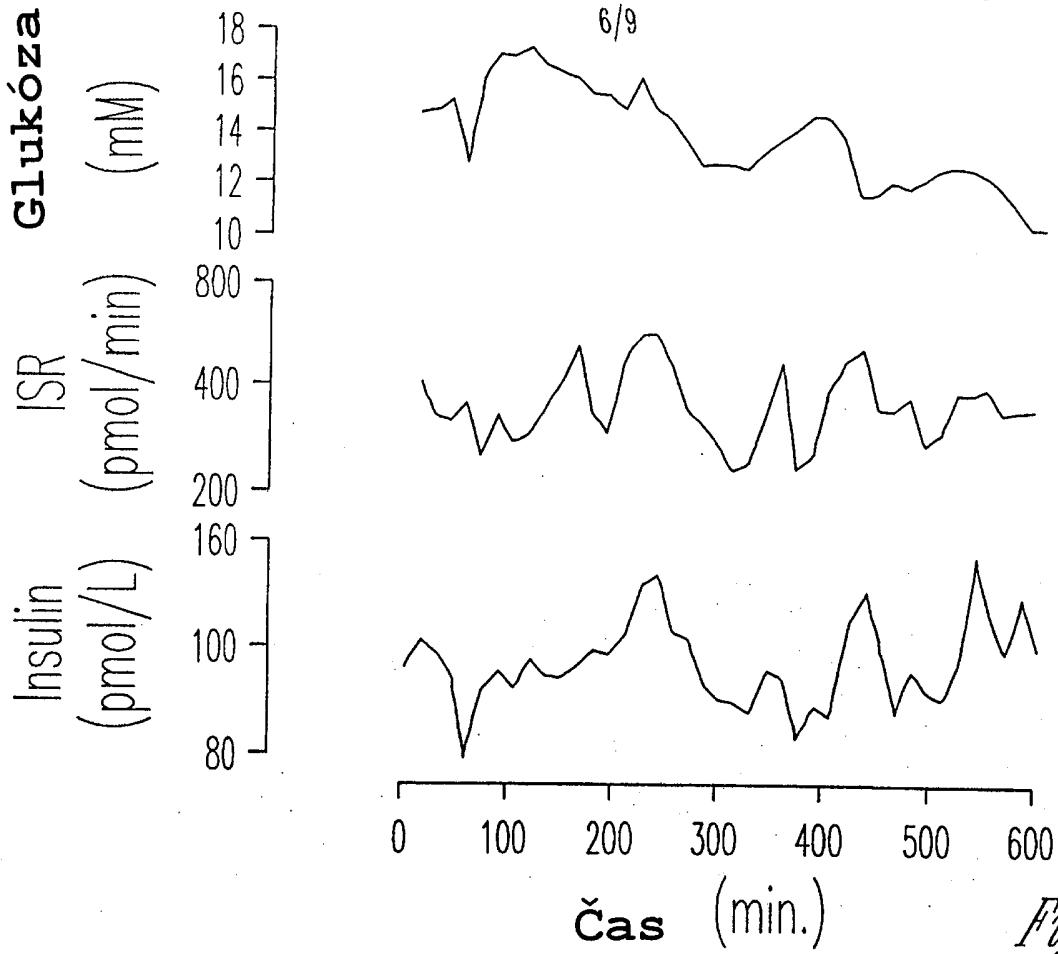


12.02.01

WO 99/64061

PCT/US99/10040

2000-4614



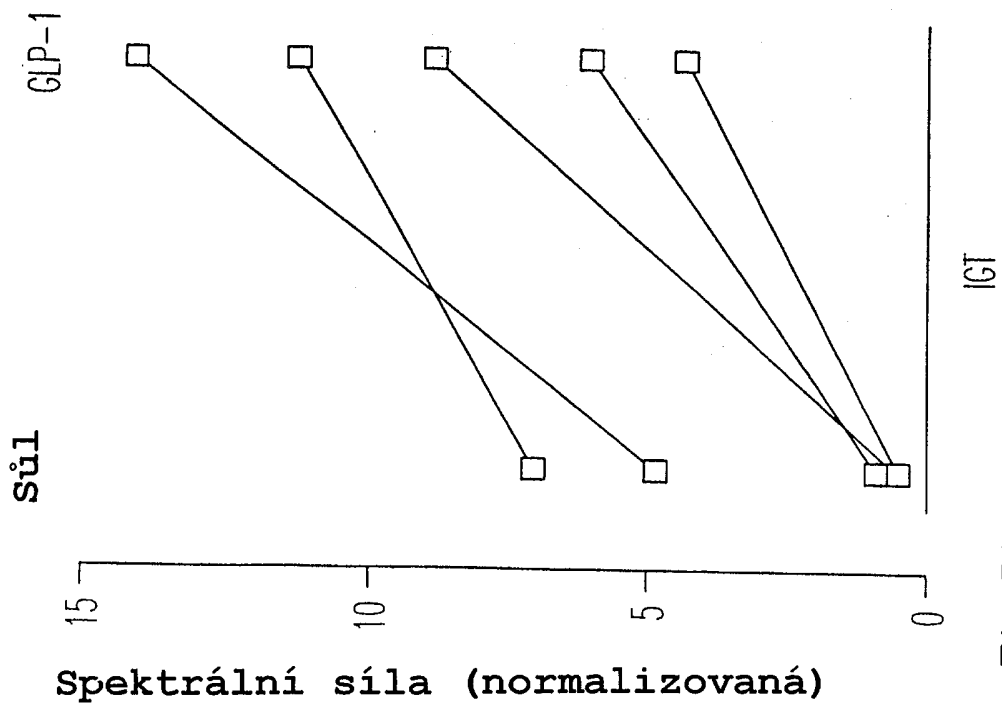
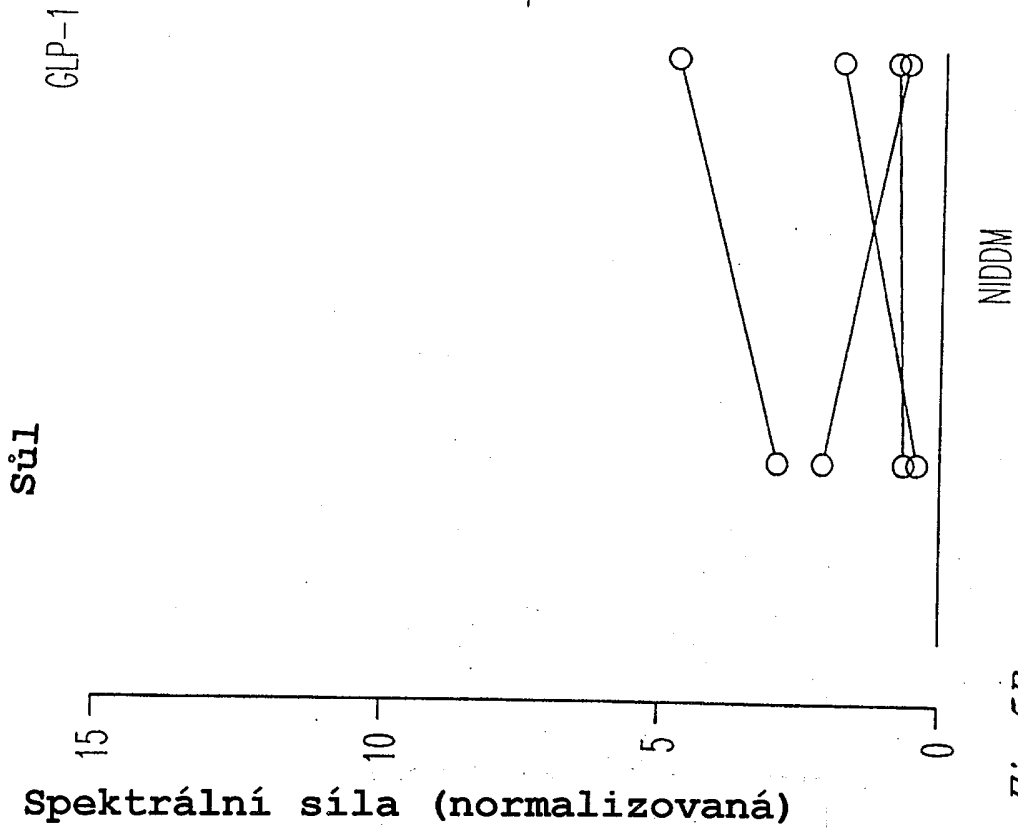
12.02.01

WO 99/64061

PCT/US99/10040

2000-4614

7/9



12.02.01

PCT/US99/10040

2000-4614

WO 99/64061

8/9

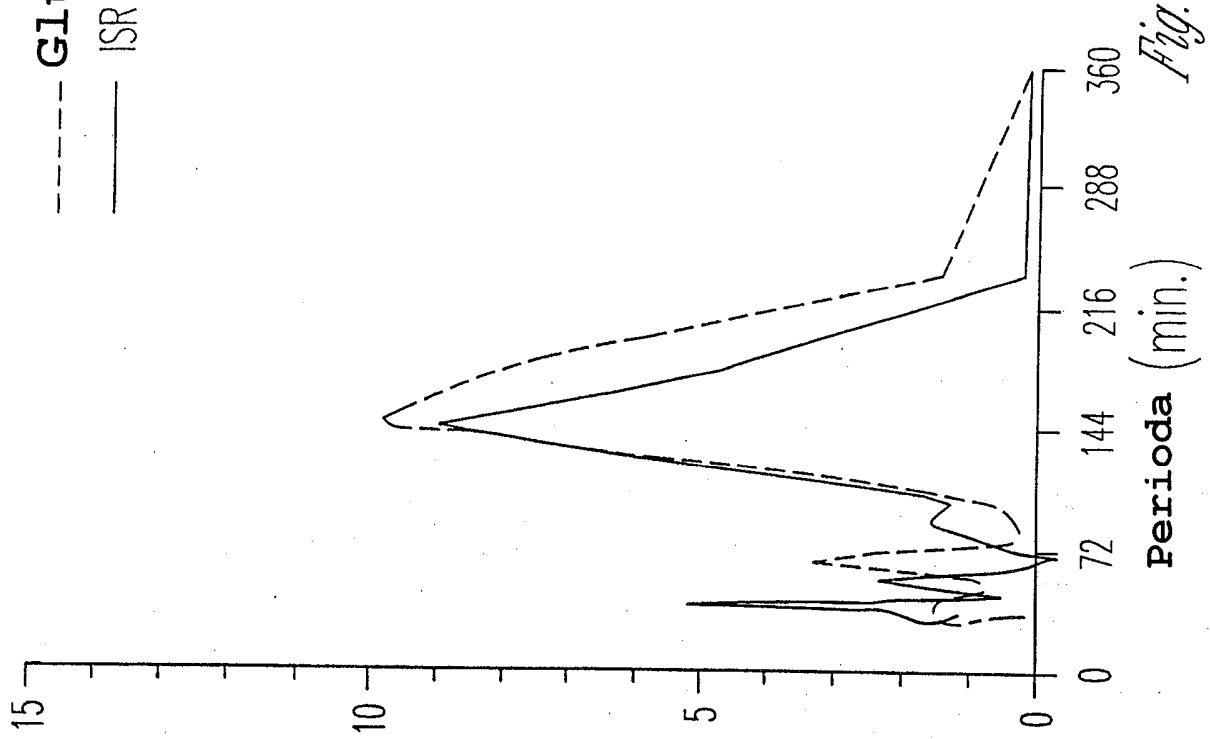


Fig. 6B

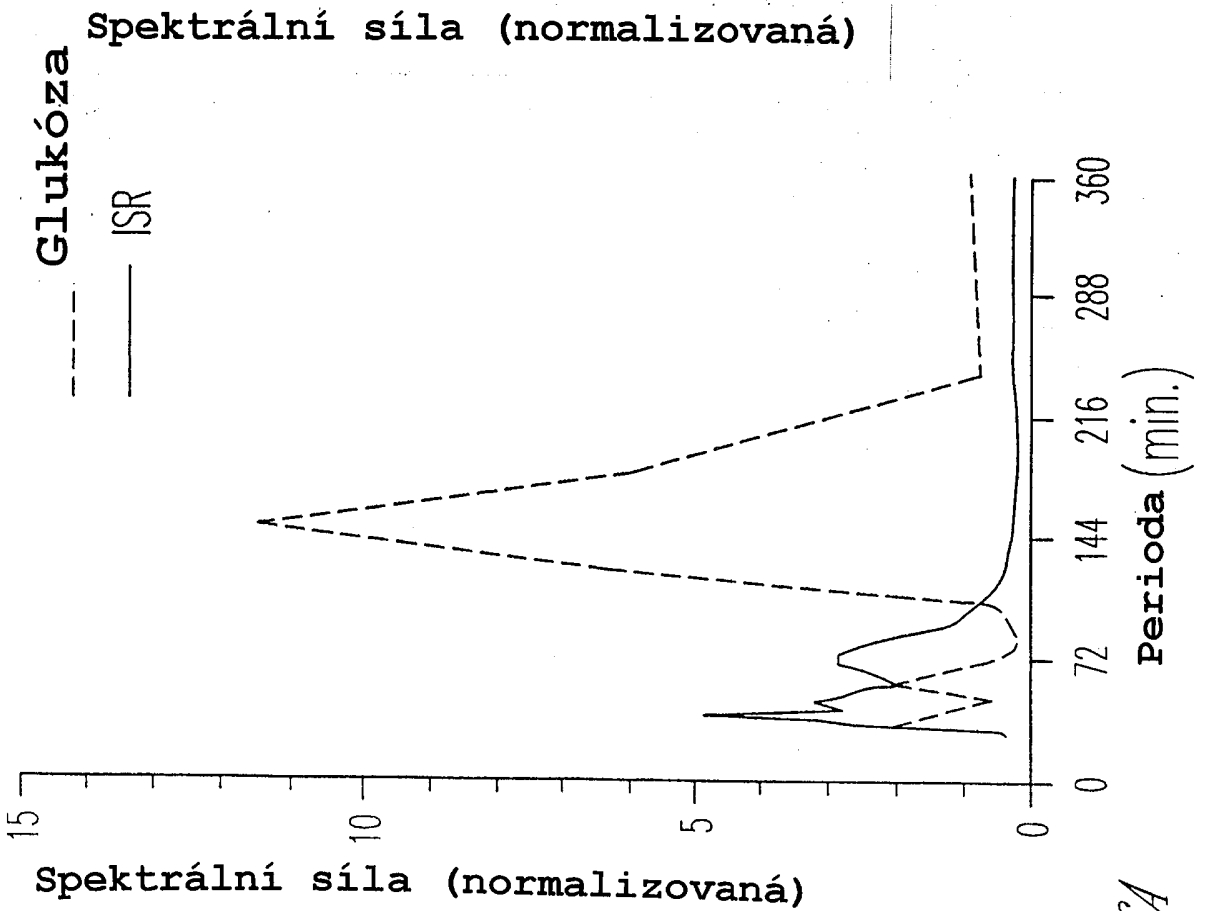


Fig. 6A

12.02.01

WO 99/64061

PCT/US99/10040

2000-4614

9/9

