

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2001 - 690

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24.08.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.08.1998 11.09.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/098273 1998/100012**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.04.2002**
(Věstník č. 4/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/19348**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/12116**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 38/16

(71) Přihlašovatel:

ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN, US;

(72) Původce:

Hughes Benjamin Lee, Indianapolis, IN, US;
Wolff Ronald Keith, Carmel, IN, US;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob podávání inzulintropních peptidů

(57) Anotace:

Použití molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vybraného ze souboru, který zahrnuje molekuly GLP-1, GLP-1 analogy a/nebo deriváty GLP-1, pro přípravu léčiva pro podávání plicní cestou k léčení hyperglykémie. Řešení se týká použití molekul glukagonu podobného peptidu-GLP-1 inhalací z inhalačního zařízení, které je vhodné pro plicní podání a schopné podání molekuly GLP-1 do plic pacienta.

Způsob podávání inzulinotropních peptidů

Oblast techniky

Předložená přihláška vynálezu se týká způsobů léčby lidí, kteří trpí diabetem mellitus a rezistencí na inzulin. Předložená přihláška vynálezu se obzvláště týká podávání glukagonu podobného peptidu-1 (GLP-1) a analogů glukagonu podobného peptidu pro systemickou absorpci plícemi, aby se tím odstranila potřeba podávání anti-diabetických sloučenin injekcí.

Dosavadní stav techniky

Je známo, že glukagonu podobný peptid-1 byl po prvé objeven v roce 1987 jakožto peptidový hormon, který je secernovaný vnitřní sekrecí střevem po požití stravy. Glukagonu podobný peptid-1 je secernovaný L-buňkami střeva potom, co byl proteolyticky upraven z prekurzorového proteinu preproglukagonu o délce řetězce 160 aminokyselin. Štěpení preproglukagonu nejdříve vede ke glukagonu podobnému peptidu-1, peptidu s řetězcem délky 37 aminokyselin, který je slabě aktivní. Následující štěpení peptidové vazby mezi zbytky aminokyselin pořadového čísla 6 a 7 vede k biologicky aktivnímu glukagonu podobnému peptidu-1, který je označován jako GLP-1(7-37). Mělo by být poznamenáno, že toto upřesnění používá nomenklaturu, která se vytvořila okolo tohoto hormonu. Konvencí běžnou v oboru je amino

konec aminokyselinového řetězce GLP-1(7-37) označován číslem 7 a karboxy konec aminokyselinového řetězce GLP-1(7-37) označován číslem 37. Přibližně 80 % ze syntetizovaného GLP-1(7-37) je amidováno na C-konci aminokyselinového řetězce potom, co se odstraní koncový zbytek glycinu v L-buňkách. Biologické účinky a metabolický obrat volné kyseliny GLP-1(7-37) a amidu GLP-1(7-36)NH₂ nejsou rozlišitelné. Jak je uvedeno v tomto dokumentu, budou tyto dvě přírodně se vyskytující formy označovány společně jako GLP-1.

GLP-1 je známý svojí schopností stimulovat sekreci inzulinu (inzulinotropní účinek), což vede k vyšší spotřebě glukózy buňkami, čímž se sníží sérová koncentrace glukózy (viz, například, Mojsov, S., Int. J. Peptide Protein Research, 40:333-343 (1992)) Podle současného stavu techniky jsou známé početné analogy a deriváty GLP-1 s prokazatelným inzulinotropním účinkem. Bylo také dokázáno, že N-koncový zbytek histidinu (His 7) je velice důležitý pro inzulinotropní účinek GLP-1 (Suzuki, S. a kol. Diabetes Res.; Clinical Practice 5 (Supp. 1) :530 (1988)).

Četní autoři dokázali spojení mezi laboratorními pokusy a savčími, obzvláště lidskými inzulinotropními odezvami na exogenní podávání GLP-1. Viz, například, Nauck, M.A. a kol., Diabetologia, 36:741-744 (1993); Gutniak, M. a kol., New England J. of Medicine, 326(20):1316-1322 (1992); Nauck, M.A. a kol., J. Clin. Invest., 91:301-307 (1993); a Thorens, B. a kol., Diabetes, 42:1219-1225 (1993)].

Na GLP-1 založené peptidy jsou velkým příslibem jakožto alternativa inzulinové terapie pro pacienty s diabetem

mellitus, u kterých selhala terapie deriváty sulfonylmočoviny. GLP-1 byl intenzivně studován akademickými vědci a toto bádání přineslo pro pacienty s diabetem mellitus typu II, u kterých selhala terapie deriváty sulfonylmočoviny, následující poznatky:

1) GLP-1 stimuluje sekreci inzulínu, ale pouze během období hyperglykémie. Bezpečnost GLP-1 v porovnání s inzulinem je zvýšena touto vlastností GLP-1 a pozorováním, že množství inzulínu, které je secernované, je proporcionální velikosti hyperglykémie. Terapie GLP-1 navíc vede k uvolnění pankreatického inzulínu a účinku inzulínu působením prvního průchodu játry na jaterní tkáň ("first-pass action"). Výsledkem toho jsou nižší koncentrace cirkulujícího inzulínu v periférii v porovnání s podkožními injekcemi inzulínu.

2) GLP-1 negativně působí na sekreci glukagonu a toto navíc spolu s dodáním inzulínu cestou vena portae pomáhá snížit nadbytečný výdej jaterní glukózy u diabetických pacientů.

3) GLP-1 zpomaluje vyprazdňování žaludku, což mu udává vhodnou vlastnost v tom směru, že se absorpce živin rozloží na delší časový úsek, čímž se sníží postprandiální vzestup hladiny glukózy.

4) Několik studií poukazuje na skutečnost, že GLP-1 zesiluje citlivost na inzulín v periferních tkáních, jakými jsou svalová tkáň a tuková tkáň.

5) GLP-1 se konečně ukázal jako potenciální regulátor chuti k jídlu.

Používání na GLP-1 založených peptidů během období jídla skýtá několik výhod vzhledem k inzulínové terapii.

Inzulinová terapie vyžaduje monitorování krevní glukózy, což je nejenom bolestivé, ale také drahé. Závislost GLP-1 na glukóze zajišťuje zvýšené terapeutické rozmezí v porovnání s inzulinem a měla by minimalizovat potřebu monitorování krevní glukózy. Intenzivní inzulinová terapie může také obzvláště v případě obézních pacientů s diabetem mellitus typu II vést k problematickému zvýšení hmotnosti pacienta.

Terapeutický potenciál přirozeného GLP-1 je dále zvýšen, pokud by se bralo na zřetel jeho použití u pacientů s diabetem mellitus typu I. Početné studie dokázaly účinnost přirozeného GLP-1 při léčbě pacientů s inzulin dependentním diabetem mellitus. Podobně jako u pacientů s diabetem mellitus typu II, je GLP-1 účinný ve snížení hyperglykémie při hladovění cestou svých glukagonostatických vlastností. Dodatečné studie poukázaly na to, že GLP-1 také snižuje postprandiální glykemické výkyvy v případě pacientů, kteří trpí na diabetes mellitus typu I, s nejvyšší pravděpodobností tím, že dochází ke zpoždění vyprazdňování žaludku. Tato pozorování poukazují na to, že GLP-1 by mohl být velice užitečný při léčbě pacientů, kteří trpí na diabetes mellitus typu I a typu II.

Podle současného stavu techniky je podávání klinicky ověřených peptidových hormonů, jakož i GLP-1 obecně prováděno cestou podkožní injekce, což je jak nepohodlné, tak neatraktivní. Mnoho vědců z tohoto důvodu studuje alternativní cesty podávání peptidových hormonů, jakými jsou podání ústy, rektem, transdermální podání a podání do

nosu. Až dosud ale tyto cesty podávání nevedly až ke klinicky ověřené terapii peptidovým hormonem.

Po dobu již několika let je známo, že některé proteiny mohou být absorbované z plic. Například inzulín podávaný do plic za pomoci inhalačního aerosolu byl poprvé popsán Gaensslenem v roce 1925. I přes skutečnost, že početné studie, které byly prováděny na lidech a na zvířatech, již poukázaly na to, že některé přípravky inzulínu mohou být absorbované plícemi, není běžně uskutečňováno podávání peptidových hormonů plícemi z důvodu velmi nízké biologické dostupnosti. Větší proteiny, jakými jsou cytokiny a růstové faktory, jejichž řetězce jsou obecně větší než 150 aminokyselinových zbytků, jsou často snadno absorbované buňkami rozprostírajícími se v prostorech plicních alveolů. Absorbce menších proteinů plícemi je však přesto mnohem méně předvídatelná; i přesto je u inzulínu (51 zbytků), kalcitoninu (32 zbytků) a (34 zbytků) popsána systemická absorbce cestou plicního podání. Viz US Patent č. 5 607 915, který je zde uveden jako reference. I přes systemickou absorpci malých proteinových hormonů plícemi je farmakodynamika podávání malých proteinových hormonů plícemi nepředvídatelná.

Tímto způsobem vzniká potřeba získání spolehlivého způsobu podávání GLP-1 a s ním spojených analogů plícemi, protože by tím pro pacienty vznikla atraktivní, neinvazivní alternativa k inzulínu. Tato potřeba se stává obzvláště důležitou, vzhledem k tomu, že inzulín má velmi úzký terapeutický index, zatímco léčba GLP-1 skýtá cestu k

normalizaci krevní glukózy pouze jako odezva na hyperglykemické stavy bez hrozby hypoglykemických stavů.

Ne všechny proteinové hormony mohou být účinně absorbované plicemi a existuje mnoho faktorů, které v tom hrají roli. Absorbce proteinů v plicích je do velké míry závislá na fyzikálních vlastnostech proteinu. I přes to, že bylo pozorováno dodávání některých proteinových hormonů plicemi, vedly fyzikální vlastnosti a malá délka GLP-1 a některých s ním spojených peptidů tímto způsobem k nejistotě, jestli by takové peptidy mohli být účinně podávány cestou do plic.

Účinné podání plicemi je závislé na schopnosti podání proteinu hluboko do plic, až k alveolárnímu epitelu. Proteinové částice, které se zachytí na epitelu horních cest dýchacích nejsou absorbované významnou mírou, protože funkcí hlenu, který se rozprostírá nad epitelem, je zachytit a potom očistit dýchací cesty mukociliárním transportem od odpadu. Tento mechanismus také přispívá největší měrou k nízké biologické dostupnosti.

Míra, kterou se proteiny neabsorbují a na místo toho vyloučí těmito cestami, záleží na jejich rozpustnosti, jejich velikosti a jiných do velké míry neupřesněných mechanismech.

I přesto, že peptidový hormon může být reprodukovatelným způsobem podáván hluboko do alveolárnímu epitelu, je těžké předurčit, jestli bude rychle absorbován a dopraven do krevního řečiště. Byly spočítány časové údaje absorbce některých proteinů podávaných plicemi a hraničí od patnácti

minut parathormon (134) až po 48 hodin pro α 1-antitrypsin. K této skutečnosti navíc existuje velké množství endogenních peptidáz plic, které mohou degradovat peptidy ještě dříve, než se absorbují. Z toho vyplývá, že čím je pro peptidovou částici potřeba delší doby, aby se rozpustila a byla absorbovaná, tak tím je větší pravděpodobnost její enzymatické inaktivace. Z důvodu malé velikosti molekuly GLP-1 a jí vlastní citlivosti vůči některým enzymům, bylo tímto způsobem velice překvapivé zjištění, že analog GLP-1, který je ve formě aerosolu, může být účinně a reprodukovatelným způsobem podáván plícemi.

Podstata vynálezu

Předložená přihláška vynálezu se týká způsobu podávání molekuly glukagonu podobného peptidu-1, který sestává z podávání do plic účinného množství peptidu pacientovi, který jeho podání potřebuje. Předložená přihláška vynálezu se také týká způsobu léčení diabetu mellitus, který sestává z podávání účinné dávky glukagonu podobného peptidu-1 do plic pacientovi, který jeho podání potřebuje. Jiný předmět předložené přihlášky vynálezu se týká způsobu léčení hyperglykémie, který sestává z podávání účinné dávky glukagonu podobného peptidu-1 do plic pacientovi, který jeho podání potřebuje.

S výhodou je molekula glukagonu podobného peptidu-1 podávána inhalací a do dolních cest dýchacích pacienta.

Glukagonu podobný peptid-1 může být podáván v nosiči, jako roztok nebo jako suspenze nebo jako suchý prášek, za použití jakéhokoli z vhodných zařízení pro podávání inhalační cestou. S výhodou je podáván glukagonu podobný peptid-1 jako částice, jejíž velikost jí dovoluje účinně se dostat do dolních cest dýchacích plic.

Podrobný popis vynálezu

Termín "GLP-1" se týká lidského glukagonu podobného peptidu-1, jehož sekvence a struktury jsou v oboru známy. Viz US Patent č. 5 120 712, který je zde uveden jako reference. Jak již bylo předtím uvedeno existují dvě přirozené formy lidského GLP-1, GLP-1(7-37) a GLP-1(7-36)NH₂, které budou v případě potřeby od sebe odlišeny.

Termín "GLP-1 analog" je definován jako molekula s jednou nebo více aminokyselinovými substitucemi, delecemi, inverzemi nebo adicemi v porovnání s molekulou GLP-1. V oboru je známo mnoho analogů GLP-1 a patří mezi ně například, GLP-1 (7-34) a GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-36), Val⁸-GLP-1 (7-37), Gln⁹-GLP-1 (7-37), D-Gln⁹-GLP-1 (7-37), Thr¹⁶-Lys¹⁸-GLP-1 (7-37) a Lys¹⁸-GLP-1(7-37). Výhodnými GLP-1 analogy jsou GLP-1(7-34) a GLP-1(7-35), které jsou popsány v U.S. Patentu č. 5 118 666, který je zde uveden jako reference.

Termín "derivát GLP-1" je definován jako molekula, která má aminokyselinovou sekvenci GLP-1 nebo GLP-1 analogu, ale která dodatečně podstoupila chemickou modifikaci jedné nebo

více ze svých postranních aminokyselinových skupin, atomů uhlíku, koncové amino skupiny nebo koncové skupiny karboxylové kyseliny.

Chemická modifikace zahrnuje neomezujícím způsobem přidávání chemických skupin, tvoření nových vazeb a odstraňování chemických skupin. Mezi modifikace postranních aminokyselinových skupin patří neomezujícím způsobem acylace e-amino skupin lyzinu, N-alkylace argininu, histidinu nebo lyzinu, alkylace skupin karboxylových kyselin glutamové kyseliny nebo asparagové kyseliny a deamidace glutaminu nebo asparaginu. Mezi modifikace koncové amino skupiny patří neomezujícím způsobem modifikace, která vede k desaminaci, N-nižšímu alkylu, N-di-nižšímu alkylu a N-acylu. Mezi modifikace koncové karboxy skupiny patří neomezujícím způsobem modifikace, které vedou k amidu, nižšímu alkyl amidu, dialkyl amidu a nižšímu alkyl esteru. Nižším alkylem je C₁-C₄ alkyl. Jedna nebo více z postranních skupin nebo koncových skupin mohou být navíc chráněny ochrannými skupinami, které jsou známé běžně zručnému chemikovi, který pracuje s proteiny. α-uhlík aminokyseliny může být mono- nebo di-metylován.

Termínem "GLP-1 molekula" se myslí GLP-1, GLP-1 analog nebo derivát GLP-1.

Jiná výhodná skupina GLP-1 analogů je definována obecným vzorcem:

R₁-X-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Y-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Z-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R₂

(SEQ ID NO: 1)

a jeho farmaceuticky přijatelnými solemi, kde: R_1 je vybrán ze souboru, sestávajícího z L-histidinu, D-histidinu, desamino-histidinu, 2-amino-histidinu, b-hydroxyhistidinu, homohistidinu, alpha-fluorometyl-histidinu, alpha-metyl-histidinu; X je vybráno ze souboru, sestávajícího z Ala, Gly, Val, Thr, Ile, alpha-metyl-Ala;

Y je vybrán ze souboru, sestávajícího z Glu, Gln, Ala, Thr, Ser a Gly; Z je vybráno ze souboru, sestávajícího z Glu, Gln, Ala, Thr, Ser a Gly; a R_2 je vybráno ze souboru, sestávajícího z NH_2 a Gly-OH; za předpokladu, že když R_1 je His, X je Ala, Y je Glu a Z je Glu, R_2 musí být NH_2 .

Nicméně jiná výhodná skupina sloučenin v souladu s předloženou přihláškou vynálezu je nalezena v WO 91/11457 (U.S. Patent č. 5 545 618, který je zde uveden jako reference) a sestává hlavně z GLP-1(7-34), GLP-1(7-35), GLP-1(7-36) nebo GLP-1-(7-37) nebo jejich amidových forem a jejich farmaceuticky přijatelných solí, majících alespoň jednu modifikaci vybranou ze souboru, sestávajícího ze:

- (a) substituce glycinem, serinem, cysteinem, treoninem, asparaginem, glutaminem, tyrosinem, alaninem, valinem, izoleucinem, leucinem, metioninem, fenylalaninem, argininem nebo D-lyzinem molekuly lyzinu v poloze 26 aminokyselinového řetězce a/nebo v poloze 34 aminokyselinového řetězce; nebo substituci glycinem, serinem, cysteinem, treoninem, asparaginem, glutaminem, tyrosinem, alaninem, valinem, izoleucinem, leucinem, metioninem, fenylalaninem, lyzinem nebo D-argininem molekuly argininu v poloze 36 aminokyselinového řetězce;
- (b) substituce aminokyselinou odolnou vůči oxidaci za molekulu tryptofanu v poloze 31 aminokyselinového řetězce;

(c) alespoň jedné substituce: tyrosinem za molekulu valinu v poloze 16 aminokyselinového řetězce; lyzinem za molekulu serinu v poloze 18 aminokyselinového řetězce; asparagovou kyselinou za molekulu glutamové kyseliny v poloze 21 aminokyselinového řetězce; serinem za molekulu glycinu v poloze 22 aminokyselinového řetězce; argininem za molekulu glutaminu v poloze 23 aminokyselinového řetězce; argininu za molekulu alaninu v poloze 24 aminokyselinového řetězce; a glutaminem za molekulu lyzinu v poloze 26 aminokyselinového řetězce; a

(d) alespoň jedné substituce: glycinem, serinem nebo cysteinem za molekulu alaninu v poloze 8 aminokyselinového řetězce; asparagovou kyselinou, glycinem, serinem, cysteinem, treoninem, asparaginem, glutaminem, tyrosinem, alaninem, valinem, izoleucinem, leucinem, metioninem nebo fenylalaninem za molekulu glutamové kyseliny v poloze 9 aminokyselinového řetězce; serinem, cysteinem, treoninem, asparaginem, glutaminem, tyrosinem, alaninem, valinem, izoleucinem, leucinem, metioninem nebo fenylalaninem za molekulu glycinu v poloze 10 aminokyselinového řetězce; a glutamovou kyselinou za molekulu asparagové kyseliny v poloze 15 aminokyselinového řetězce; a

(e) substituce glycinem, serinem, cysteinem, treoninem, asparaginem, glutaminem, tyrosinem, alaninem, valinem, izoleucinem, leucinem, metioninem nebo fenylalaninem nebo D-acylovanou nebo N-acylovanou nebo alkylovanou formou histidinu za molekulu histidinu v poloze 7 aminokyselinového řetězce;

kde, v případě substitucí (a), (b), (d) a (e) mohou být substituované aminokyseliny popřípadě aminokyselinami v D-formě a aminokyseliny substituované v poloze 7

aminokyselinového řetězce mohou popřípadě být v N-acylované nebo N-alkylované formě.

Vzhledem k tomu, že enzym dipeptidyl-peptidáza IV (DPP IV) může být odpovědný za *in vivo* pozorovanou rychlou inaktivaci podávaného GLP-1, [viz, například, Mentlein, R. a kol., Eur. J. Biochem., 214:829-835 (1993)], tak je výhodné podávání GLP-1 analogů a derivátů GLP-1, které jsou chráněny před účinkem DPP IV a ještě výhodnější je podávání Gly⁸-GLP-1 (7-36)NH₂, Val⁸-GLP-1 (7-37)OH, α-metyl-Ala⁸-GLP-1 (7-36)NH₂ a Gly⁸-Gln²¹-GLP-1 (7-37)OH nebo jejich farmaceuticky přijatelných solí.

Použití molekuly nárokované v U.S. Patentu č. 5 188 666, který je zde uveden jako reference, v předložené přihlášce vynálezu je výhodné. Taková molekula je vybrána ze skupiny sestávající z peptidu sestávajícího z aminokyselinové sekvence:

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-X (SEQ ID NO: 2)

kde X je vybráno ze souboru, sestávajícího z Lys a Lys-Gly; a derivátu uvedeného peptidu, kde je uvedený peptid vybrán ze souboru, sestávajícího z: farmaceuticky přijatelné adiční sole kyseliny uvedeného peptidu; farmaceuticky přijatelné karboxylátové sole uvedeného peptidu; farmaceuticky přijatelného nižšího alkylesteru uvedeného peptidu; a farmaceuticky přijatelného amidu uvedeného peptidu, který je vybrán ze souboru, sestávajícího z amidu, nižšího alkyl amidu a nižší dialkyl amidu.

Jiná výhodná skupina molekul pro použití v předložené přihlášce vynálezu sestává ze sloučenin objevených v U.S. Patent č. 5 512 549, který je zde uveden jako reference, sestávajících z obecného vzorce:

R¹-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Xaa-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-R³ R²

(SEQ ID NO: 3)

a jejich farmaceuticky přijatelných solí, kde je R¹ vybrán ze souboru, sestávajícího z 4-imidazopropionylu, 4-imidazoacetylu nebo 4-imidazo-a, dimetyl-acetylu; R² je vybrán ze souboru, sestávajícího z C₆-C₁₀ acylu, který se nevětví nebo R² chybí; R³ je vybrán ze souboru, sestávajícího z Gly-OH nebo NH₂; a Xaa představuje Lys nebo Arg.

Výhodnějšími sloučeninami SEQ ID NO: 3 pro použití v předložené přihlášce vynálezu jsou ty, ve kterých Xaa představuje Arg a R² představuje C₆-C₁₀ acyl, který se nevětví.

Více výhodnějšími sloučeninami SEQ ID NO: 3 pro použití v předložené přihlášce vynálezu jsou ty, ve kterých Xaa představuje Arg, R² představuje C₆-C₁₀ acyl, který se nevětví, R³ představuje Gly-OH a R₁ představuje 4-imidazopropionyl a R³ představuje Gly-OH.

Ještě více výhodnějšími výhodné sloučeniny SEQ ID NO: 3 pro použití v předložené přihlášce vynálezu jsou ty, ve kterých Xaa představuje Arg, R² představuje C₆-C₁₀ acylu, který se

nevětví, R^3 představuje Gly-OH a R_1 představuje 4-imidazopropionyl.

Úplně nejvýhodnější látkou SEQ ID NO: 3 pro použití v předložené přihlášce vynálezu je ta, ve které Xaa představuje Arg, R^2 představuje C_8 acyl, který se nevětví, R^3 představuje Gly-OH a R^1 představuje 4-imidazopropionyl.

Použití Val⁸-GLP-1 (7-37)OH nebo jeho farmaceuticky přijatelné sole tak, jak je nárokováno v US Patentu č. 5 705 483, který je zde uveden jako reference, v předložené přihlášce vynálezu je velmi výhodné.

Způsoby pro přípravu GLP-1, GLP-1 analogů nebo derivátů GLP-1, které jsou potřebné v předložené přihlášce vynálezu jsou známé v oboru a jsou známé běžně zkušenému chemikovi, který pracuje s proteiny nebo biochemikovi. Aminokyselinová část aktivní látky, která je použita v předložené přihlášce vynálezu nebo její prekurzor, mohou být vytvořeny buď chemickou syntézou v pevné fázi, purifikací GLP-1 molekuly z přírodních zdrojů nebo technologií rekombinantní DNA.

Rutinní techniky organické syntézy umožňují alkylation a acylaci derivátů GLP-1.

Termín "s GLP-1 související sloučenina" se týká jakékoli látky zapadající do definice GLP-1, GLP-1 analogu nebo derivátu GLP-1.

Termín "ochranná sloučenina" se týká sloučeniny, která je přidána k farmaceutickému přípravku, aby účinkovala jako

anti-mikrobiální činidlo. Přípravek pro parenterální podání musí splňovat požadavky ochranného účinku, aby z něho mohl být komerčně dostupný výrobek, který má široké použití. Mezi ochranné sloučeniny, které jsou v oboru známé jako účinné sloučeniny a které jsou přijatelné pro podání v parenterálních přípravcích patří benzalkonium chlorid, benzetonium, chlorohexidin, fenol, m-kresol, benzyl alkohol, metylparaben, chlorobutanol, o-kresol, p-kresol, chlorokresol, dusičnan fenylrtuti, timerozal, benzoová kyselina a různé jejich směsi. Viz, například, Wallhauser, R., Develop. Biol. Standard, 24: 9-28- (Basel, S. Krager, 1974).

Termín "pufr" nebo "farmaceuticky přijatelný pufr" se týká sloučeniny, kterou je možné bezpečně použít v proteinových přípravcích a která svým účinkem kontroluje pH přípravku na hodnotě pH, která je pro přípravek požadovaná. Mezi farmaceuticky přijatelné pufry, které kontrolují pH přípravku na hodnotě pH, která jde od mírně kyselého pH do mírně zásaditého pH patří, například, takové sloučeniny, kterými jsou fosfátová pufr, acetátový pufr, citrátový pufr, TRIS, pufr argininu nebo pufr histidinu.

Termín "činidlo izotonicity" se týká sloučeniny, která je fyziologicky tolerována a která dodává přípravku požadovanou tonicitu, aby se zamezilo čistému toku vody přes buněčnou membránu. Sloučeniny, mezi které patří sloučeniny jako glycerin, jsou běžně používané pro tyto účely v rozmezí známých koncentrací.

chybí str. 13 originálu

úrovně inzulínu v oběhu následovaná rychlým poklesem hladiny glukózy v krvi. Různá inhalační zařízení jsou schopná typicky poskytnout podobné farmakokinetické vlastnosti v případě srovnání částic, které mají podobné velikosti a v případě srovnání přibližně stejné velikosti podání do plic.

Ve shodě s předloženou přihláškou vynálezu mohou být podávány GLP-2 a GLP-1 analogy a deriváty jedním z různých inhalačních zařízení, které jsou známé v oboru, pro podávání terapeutického činidla inhalační cestou. Mezi tato zařízení patří inhalátory měřených dávek, nebulizéry, inhalátory suchého prášku, spreje a jim podobná zařízení. S výhodou jsou GLP-1 a GLP-1 analogy a deriváty podávány inhalátory suchého prášku nebo sprejem. Existuje několik požadovaných znaků inhalačního zařízení pro podávání GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů. Například je podání inhalačním zařízením s výhodou spolehlivé, reprodukovatelné a přesné. Z důvodu dobrého vdechování by inhalační zařízení mělo podávat malé částice, například o velikosti menší než přibližně 10 μm středního hmotnostního aerodynamického průměru ("mass median aerodynamic diameter" - MMAD), s výhodou o velikosti okolo 1-5 μm MMAD. Některými specifickými příklady inhalačních zařízení, která jsou komerčně dostupná nebo těch, která jsou posledních fázích svého vývoje, vhodných pro provedení tohoto vynálezu jsou Turbohaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), Spiros™ inhalátor (Dura), zařízení, která byla vyvinuta firmou Inhale Therapeutics, AERx™ (Aradigm), Ultravent® nebulizér (Mallinckrodt), Acorn II® nebulizér (Marquest Medical Products), Ventolin® inhalátor měřené dávky

(Glaxo), Spinhaler® inhalátor prášku (Fisons) nebo jiná podobná inhalační zařízení.

Přípravek GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů, množství podávaného přípravku a doba trvání podávání jedné dávky záleží na typu používaného inhalačního zařízení, což bude známo pracovníkům, kteří jsou zkušení v oboru. V případě některých systémů pro podávání aerosolů, kterými jsou taková jako nebulizéry, bude záležet frekvence podávání a časový úsek, po dobu kterého bude systém aktivován, hlavně koncentraci GLP-1 molekuly v aerosolu. Například při vyšších koncentracích GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů v roztoku nebulizéru mohou být používané kratší periody podávání. Zařízení, kterými jsou taková, jako inhalátory měřených dávek mohou vytvořit vyšší koncentrace aerosolu a mohou pracovat po dobu kratších period podávání požadovaného množství GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů. Zařízení, kterými jsou taková, jako inhalátory prášku podávají aktivní činidlo, dokud není ze zařízení vyloučeno dané množství činidla. V případě tohoto typu inhalátoru určuje množství GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů v daném množství prášku dávku, která je podávána při jediném podávání.

Velikost částice GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů v přípravku podávaného inhalačním zařízením je kritická vzhledem ke schopnosti proteinu usadit se v plicích a s výhodou v dolních cestách dýchacích nebo alveolech. S výhodou je přípravek GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů připraven tak, že se v plicích usadí alespoň přibližně 10 % peptidu, který byl podáván, s výhodou od množství okolo 10

% do okolo 20 % nebo více. Je známo, že maximální účinnost usazení v plicích u lidí, kteří dýchají ústy, je dosažena s částicemi o velikosti okolo 2 μm do velikosti okolo 3 μm MMAD. Když je velikost částic vyšší než přibližně 5 μm MMAD, tak účinnost usazení v plicích významně poklesne. Velikost částic menší než přibližně 1 μm MMAD vede ke sníženému usazení v plicích a podávání částic s dostatečnou hmotností tak, aby byla terapeuticky účinné, se stává těžké. Částice GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů podávané inhalační cestou mají velikost částice s výhodou menší než přibližně 10 μm MMAD, výhodněji v oblasti velikostí okolo 1 μm do okolo 5 μm MMAD a nejvýhodněji v oblasti okolo 2 μm do okolo 3 μm MMAD. Příprava GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů je vybrána tak, aby vedla k požadované velikosti částice pro vybrané inhalační zařízení.

Pro podávání ve formě suchého prášku jsou GLP-1 a GLP-1 analogy a deriváty s výhodou připraveny ve formě částic, kde je velikost emitované částice menší než přibližně 10 μm MMAD, s výhodou okolo 1 do okolo 5 μm MMAD a nejvýhodněji okolo 2 μm do okolo 3 μm MMAD.

Částice, která má výhodnou velikost, je účinná pro podání do alveolů pacientových plic. S výhodou je suchý prášek do značné míry složen z částic vytvořených tak, že většina částic má velikost v požadovaném rozmezí: s výhodou alespoň okolo 50 % suchého prášku sestává z částic, které mají průměr menší než přibližně 10 μm MMAD. Takových přípravků může být dosaženo sušením rozprašováním, drcením nebo kondenzací v kritickém bodu roztoku, který obsahuje GLP-1

molekulu částice a jiné požadované ingredienty. Jiné způsoby, které jsou přihlášce vynálezu užitečné, jenž jsou také vhodné pro tvorbu částic, jsou způsoby, které jsou známé v oboru.

Částice jsou obvykle odděleny z přípravku suchého prášku v nádobě a potom jsou dopraveny do plic pacienta cestou nosného proudu vzduchu. V případě běžných inhalátorů suchých prášků je typicky síla nutná pro rozpadnutí pevné látky pouze pacientovou inhalací. Jedním z vhodných inhalátorů suchého prášku je Turbohaler™, který je vyráběný firmou Astra (Södertalje, Sweden). V případě jiného typu inhalátoru aktivuje proud vzduchu, který je vytvořený pacientovou inhalací poháněcí motor, který od sebe odděluje částice GLP-1 molekuly. Dura Spiros™ inhalátor patří mezi taková zařízení.

Přípravky GLP-1 a analogů GLP-1 a derivátů pro podávání z inhalátoru suchého prášek typicky obsahují jemně dělený suchý prášek, který obsahuje peptid, ale prášek může také obsahovat objemové činidlo, nosič, excipient, jiné aditivum a podobně. Aditiva mohou být přidána do přípravku GLP-1 a analogů GLP-1 a derivátů ve formě suchého prášku, například, aby se prášek zředil tak, jak je to požadované pro podání částic z inhalátoru prášku, aby se ulehčilo zpracování přípravku, aby se přípravku dodaly výhodné vlastnosti prášku, aby se ulehčila disperze prášku z inhalačního zařízení, aby se stabilizoval přípravek (například antioxidanty nebo pufry), aby se přípravku dodala chuť a podobně. S výhodou aditivum neovlivňuje nepříznivě pacientovy cesty dýchacích. GLP-1 a GLP-1

analogy a deriváty mohou být smíchány s aditivem na molekulární úrovni nebo může pevný přípravek obsahovat částice peptidu smíchané s částicemi aditiva nebo povlečené na částice aditiva. Typicky aditiva obsahují mono-, di-, a polysacharidy; alkoholy cukrů a jiné polyoly, kterými jsou například, laktóza, glukóza, rafinóza, melezitóza, laktitol, maltitol, trehalóza, sacharóza; manitol, škrob nebo jejich kombinace; povrchově aktivní činidla, kterými jsou sorbitoly, difosfatidyl cholin nebo lecitin; a podobně.

Aditivum, jako je objemové činidlo, je typicky přítomné v množství účinném pro účel, který je výše popsán, často v množství okolo 50 % do okolo 90 % vztaženo k hmotnosti přípravku. Dodatečná činidla pro tvorbu proteinových přípravků, které jsou známá v oboru mohou být také obsažena v přípravku.

Jiný předmět předložené přihlášky vynálezu se týká vytvoření spreje, který obsahuje GLP-1 a GLP-1 analogy a deriváty, protlačením suspenze nebo roztoku peptidu pod tlakem přes trysku. Velikost trysky a konfigurace trysky, použitý tlak a stupeň napájení tekutiny mohou být vybrány tak, aby se dosáhlo požadovaného výkonu a velikosti částice. Elektro-sprej může být vytvořený například elektrickým polem ve spojení s napájením kapilárou nebo napájením tryskou. S výhodou, mají kapičky GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů, které jsou dodávané sprejem mají velikost inhalovaných kapek menší než je velikost přibližně 10 μm MMAD, s výhodou v oblasti okolo 1 μm do okolo 5 μm MMAD a nejvýhodněji okolo 2 μm do okolo 3 μm MMAD.

Přípravky GLP-1 a analogů GLP-1 a derivátů, které jsou vhodné pro použití se sprejem mají typicky hmotnost okolo 1 mg do okolo 20 mg peptidu na ml roztoku. Přípravek může obsahovat činidla, kterými jsou taková, jako excipient, pufr, činidlo izotonicity, ochranná sloučenina, povrchově aktivní činidlo a kationty kovu. Přípravek může také obsahovat excipient nebo činidlo, aby se stabilizoval peptid, kterými jsou taková, jako pufr, redukční činidlo, objemový protein nebo uhlovodík. Objemové proteiny, které jsou potřebné pro tvorbu přípravku GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů obsahují albumin, protamín a podobně.

Mezi typické uhlovodíky, které jsou potřebné pro tvorbu přípravku GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů patří sacharóza, manitol, laktóza, trehalóza, glukóza a podobně. Přípravky GLP-1 a analogů GLP-1 a derivátů mohou také obsahovat povrchově aktivní činidlo, který může snížit nebo zamezit povrchovými silami indukovanému shlukování peptidu, které je způsobené atomizací roztoku, když vytváří aerosol. Mohou být použita četná konvenční povrchově aktivní činidla, kterými jsou estery mastných kyselin a polyoxyetylenů a alkoholy a estery mastných kyselin a polyoxyetylenů sorbitolu. Množství budou obecně v rozmezí mezi 0,001 a 4 % vztaženo k hmotnosti přípravku. Jiná povrchově aktivní činidla, jako difosfatidylcholin nebo lecitin mohou být také použity. Obzvláště výhodná povrchově aktivní činidla pro účel předložené přihlášky vynálezu jsou polyoxyetylen sorbitan monooleát, polysorbát 80, polysorbát 20 a podobně. Dodatečná činidla, která jsou známá v oboru pro tvorbu přípravků proteinů mohou být také obsažena v přípravku.

GLP-1 a GLP-1 analogy a deriváty mohou být podávány nebulizérem, jako je tryskový nebulizér nebo nadzvukový nebulizér. V proudovém nebulizéru je typicky používán zdroj stlačeného vzduchu za účelem vytvoření proudu vzduchu, který má vysokou rychlost a prochází otvorem. Jak plyn za tryskou expanduje, vytváří se oblast, ve které je podtlak, který táhne roztok peptidu kapilárou, která je spojena s rezervoárem tekutiny. Proud tekutiny z kapiláry je při svém výstupu z kapiláry rozdělen do nestabilních vláken a kapiček, čímž se vytvoří aerosol. Může být použito rozmezí konfigurací, velikostí proudů a typů usměrňovačů proudu, aby se dosáhlo požadovaných výkonostních parametrů z daného tryskového nebulizéru. U nadzvukového nebulizéru je používána vysokofrekvenční elektrická energie, aby se vytvořila vibrační energie, mechanická energie, typicky díky použití piezoelektrického transduktéru. Tato energie je přenášena na přípravek peptidu buď přímo nebo přes spřaženou tekutinu, čímž se vytvoří aerosol. S výhodou mají kapky GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů, které jsou dodávány nebulizérem, velikost částice menší než přibližně 10 μm MMAD, s výhodou v oblasti okolo 1 μm do okolo 5 μm MMAD a nejvýhodněji okolo 2 μm do okolo 3 μm MMAD.

Přípravky GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů, které jsou vhodné pro použití s nebulizérem, buď proudovým nebulizérem nebo ultrazvukovým nebulizérem, typicky obsahují vodný roztok peptidu o koncentraci okolo 1 mg do okolo 20 mg na ml roztoku. Přípravek může obsahovat činidla jako je excipient, pufr, činidlo izotonicity, ochranná sloučenina, povrchově aktivní činidlo a divalentní kationt kovu.

Přípravek může také obsahovat excipient nebo činidlo, aby se stabilizoval peptid, kterými jsou pufr, redukční činidlo, objemový protein nebo cukr. Objemové proteiny, které jsou potřebné pro tvorbu přípravku GLP-1 a GLP-1 analogů a derivátů zahrnují albumin, protamin a podobně. Mezi typické cukry, které jsou potřebné pro tvorbu přípravku proteinů spojených s GLP-1 patří sacharóza, manitol, laktóza, trehalóza, glukóza a podobně. Přípravky GLP-1 a analogů GLP-1 a deriváty mohou také obsahovat povrchově aktivní činidlo, které může snížit nebo zamezit povrchovými silami indukovanému shlukování peptidu, které je způsobené atomizací roztoku, když vytváří aerosol.

Mohou být použita četná konvenční povrchově aktivní činidla, jako jsou estery mastných kyselin a polyoxyetylenů a alkoholy a estery mastných kyselin a polyoxyetylenů sorbitolu. Množství budou obecně v rozmezí mezi 0,001 a 4 % vztaženo k hmotnosti přípravku. Jiné povrchově aktivní činidla, kterými jsou takové jako difosfatidyl cholin nebo lecitin mohou být také použity. Obzvláště výhodné povrchově aktivní činidla pro účel předložené přihlášky vynálezu jsou polyoxyetylen sorbitan monooleát, polysorbát 80, polysorbát 20 a podobně. Dodatečná činidla, která jsou známá v oboru, pro tvorbu přípravku proteinu, kterými jsou k GLP-1 se vztahující molekuly, mohou být také obsažena v přípravku.

Jiný aspekt předložené přihlášky vynálezu se vztahuje k inhalátoru měřených dávek ("metered dosis inhalator") (MDI). V tomto provedení jsou pohonná hmota, GLP-1 a GLP-1 analogy a deriváty a jakékoli excipienty nebo jiná aditiva obsažena ve formě směsi v kanistru, který obsahuje stlačený

plyn v tekutém skupenství. Ventil, který odměřuje, po uvedení do chodu vypouští směs ve formě aerosolu, který s výhodou obsahuje inhalované částice v rozmezí velikosti menší než přibližně 10 μm MMAD, s výhodou okolo 1 μm do okolo 5 μm MMAD a nejvýhodněji okolo 2 μm do okolo 3 μm MMAD. Požadovaná velikost částice aerosolu může být získána za použití přípravku GLP-1 a analogů GLP-1 a derivátů vytvořených četnými způsoby, které jsou známé znalci v oboru, který sestávají z proudového drcení, sušení rozprašováním nebo kondenzací v kritickém bodu nebo způsoby, které jsou jim podobné. Výhodné inhalátory měřených dávek sestávají z těch, který jsou vyráběny firmou 3M nebo Glaxo a za použití a hydrofluoruhlíkové pohonné hmoty.

Přípravky GLP-1 a analogů GLP-1 a derivátů pro použití v zařízení inhalátoru měřených dávek budou obecně obsahovat jemně rozdrcený prášek, který obsahuje peptid ve formě suspenze v jiném, než vodném médiu, například, suspendovaný v pohonné hmotě s přidáním povrchově aktivního činidla. Pohonnou hmotou může být jakýkoli konvenční materiál, který je používán pro tento účel, jakým je plně chlorofluorovaný uhlovodík, chlorofluorovaný uhlovodík, fluorovaný uhlovodík nebo uhlovodík, které zahrnují trichlorfluormetan, dichlordifluormetan, dichlortetrafluoretanol a 1,1,1,2-tetrafluoretan, HFA-134a (hydrofluoroalkan-134a), HFA-227 (hydrofluoroalkan-227) a podobně. S výhodou je pohonnou hmotou fluorovaný uhlovodík. Povrchově aktivní činidlo může být vybráno tak, aby stabilizovalo GLP-1 molekulu ve formě suspenze v pohonné hmotě tak, aby chránilo aktivní činidlo proti chemické degradaci a tak podobně. Mezi vhodné

povrchově aktivní činidla patří sorbitan trioleát, sójový lecitin, kyselina olejová a podobně. V některých případech roztoků aerosolů je výhodné použít rozpouštědla jako je etanol. Jiná povrchově aktivní činidla, jako je difosfatidyl cholin nebo lecitin, mohou také být použity. Dodatečná činidla pro přípravu proteinových přípravků, která jsou známá v oboru, mohou být také obsažena v přípravku.

Předložená přihláška vynálezu také se týká farmaceutické sloučeniny nebo přípravku, který obsahuje GLP-1 a GLP-1 analogy a deriváty a který je vhodný pro podávání inhalační cestou. Ve shodě s předloženou přihláškou vynálezu, GLP-1 a GLP-1 analogy a deriváty mohou být použity pro přípravu přípravku nebo léku, které jsou vhodné pro podávání inhalační cestou. Předložená přihláška vynálezu také se týká způsobů pro přípravu přípravků, které obsahují k GLP-1 vztahující se molekuly ve formě, které je vhodná pro podávání inhalační cestou. Například, přípravek suchého prášku může být vyroben několika způsoby, za použití konvenčních technik. Částice, jejíž velikost je v rozmezí, které je přiměřené pro maximální usazení v nižších cestách dýchacích, mohou být vyrobeny mikronizací, drcením, sušením rozprašováním a podobně. Tekutý přípravek může být vyroben rozpuštěním peptidu ve vhodném rozpouštědle, kterým je voda, s přiměřenou hodnotou pH,, která obsahuje pufry nebo jiné excipienty.

Předložená přihláška vynálezu je lépe srozumitelná s odkazem na následující příklady. Smyslem těchto příkladů je být reprezentativní pro specifická provedení předložené

příhlášky vynálezu a jejich smyslem není jakkoli omezovat rozsah vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Sérová farmakokinetika Val⁸-GLP-1 u psů Beagle po podávání do plic

Analog GLP-1, Val⁸-GLP-1(7-37)OH (SEQ ID NO: 4) byl připraven v E. coli za použití konvenčních technik rekombinantní DNA a purifikován do homogeního stavu.

NH₂-His-Val-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-GlyArg-Gly-OH (SEQ ID NO: 4)

Jedna skupina 6 samic psů Beagle byla vystavena inhalovanému Val⁸-GLP-1 po dobu 15 minut při průměrné koncentraci aerosolu o velikosti 77,2 µg/l vytvořené z roztoku Val⁸-GLP-1 ve sterilní vodě. Těmto zvířatům byla podána dávka 100 µg/kg cestou podkožního podání přibližně 1 týden potom, co byla vystavena inhalaci. Klidový dechový objem, dechová frekvence a minutový dechový objem byly monitorovány před obdobím podání a během období podání. Byla odebrána krev analýzu plazmatických koncentrací Val⁸-GLP-1 v různých časových intervalech, které následovaly po inhalaci a podkožním podání.

Přibližně 4 hodiny po expozici byla sebrána tekutina z bronchoalveolární laváže (BAL) a její analýza se týkala LDH, celkové bílkoviny, počtů buněk a diferenciálního obrazů bílých krvinek.

Podání Val⁸-GLP-1 bylo dobře tolerované při inhalační dávce o velikosti 1198 µg/kg a odhadované usazené dávce v plicích o velikosti 240 µg/kg. Podkožní podání 100 µg/kg bylo také dobře tolerované všemi zvířaty. Inhalace a podkožní podání Val⁸-GLP-1 byly podávány za použití připravených přípravků.

Nebyla zaznamenána s léčením spojená klinická pozorování; tělesné hmotnosti nebyly nepříznivě ovlivněny Val⁸-GLP-1. Byly pozorované pouze minimální účinky na plíce. Bylo pozorované zvýšení jak klidového dechového objemu a tak zvýšení minutového dechového objemu během 15 minutových inhalačních expozic, ale údaje byly velice různorodé. Nebyly pozorované žádné významné změny v případě LDH, počtů červených krvinek, počtů bílých krvinek, počtů neutrofilů, počtů lymfocytů, počtů eosinofilů, počtů epitelových buněk, počtů makrofágů, počtů basofilů nebo počtů monocytů. Bylo zde mírné zvýšení celkové bílkoviny, které následovalo podání aerosolu Val⁸-GLP-1.

Výsledky této studie prokázaly, že Val⁸-GLP-1, který byl podáván do plic psů Beagle inhalační cestou, měl dobrou biologickou dostupnost (40 % vzhledem k AUC) v porovnání s podkožním podáním: Val⁸-GLP-1 byl dobře tolerován dobu do 15 minut s minimálními účinky na plíce při průměrné inhalované dávce o velikosti 1198 µg/kg, což bylo v této studii stupněm nepozorovaných nežádoucích účinků ("no-observed-adverse-effects level") (NOAEL).

Příprava roztoků k podání

Roztoky Val⁸-GLP-1 byly připraveny v den podání v koncentracích o velikosti 0,5 mg/ml ve sterilní vodě pro podkožní podání nebo 8 mg/ml ve sterilní pro plicní podávání. Dodatečný roztok Val⁸-GLP-1 (8 mg/ml) byl připraven na konci fáze života za účelem určení distribuce velikosti částic Val⁸-GLP-1, který je ve formě aerosolu. Roztoky byly filtrovány přes 0,22 mikronový kanistrový filtr, který váže proteiny o nízké molekulové hmotnosti. pH roztoku bylo upraveno za pomoci roztoku hydroxidu sodného na pH o hodnotě 7,47.

Pokusná zvířata

V této studii bylo použito šest samic psů Beagle (Marshall Farms, North Rose, NY). Každé zvíře bylo jedinečným způsobem identifikováno pětímístným číslem zvířete a sedmimístným číslem, které bylo vytetováno (umístěno na vnitřním uchu), které bylo zapsáno na jejich kartičku na kleci. Všechna zvířata byla navyknuta před začátkem studie na těsné popruhy. Hmotnost zvířat na začátku studie se pohybovala v rozmezí od 8,4 do 11,1 kg. Věk zvířat na začátku studie se pohyboval od 33 do 37 týdnů.

Umístění a péče o pokusné zvíře

Zvířata bydlela po dvou v klecích, které byly vyrobeny z nerezové oceli s výjimkou dnů, kdy docházelo k expozici. Každé zvíře bydlelo individuálně v den expozice za účelem monitorování jejich režimu stravy. Místnosti byly za pomoci

termostatu udržovány při teplotě o velikosti 70 °F a aktuální teplota byla udržována v rozmezí ± 8 °F vzhledem k hodnotě, na kterou byl nastaven termostat. Kontrolní systém prostředí byl nastaven tak, aby udržoval relativní vlhkost na hodnotě 20 % a maximálně na hodnotě 80 %. Světlo bylo rozsvíceno v 12-ti hodinových cyklech s tím, že se rozsvěcelo v časovém úseku od 6 hodin do v 18 hodin. Světla se potom zhasínala v časovém úseku 18 hodin a 6 hodiny s výjimkou doby, kdy se odebíraly vzorky krve. Zvířata byla krmena jednou za den Hill's Science Diet. Zvířata byla držena bez jídla přibližně 12 hodin předtím, než byla exponovaná. Voda z vodovodu byla poskytnuta zvířatům dle libosti s výjimkou doby během expozic.

Skupiny a doba trvání studie

Všech 6 psů bylo exponováno po dobu 15 minut Val⁸-GLP-1, který byl ve formě aerosolu. Cílená dávka Val⁸-GLP-1 pro usazení do plic Val⁸-GLP-1 expozic nabývala hodnotu 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti. Přibližně 7 dní po plicním podání Val⁸-GLP-1, bylo všem psům podáno 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Val⁸-GLP vzhledem k tělesné hmotnosti cestou podkožního podání.

System expozice

Psi byli testováni, zatímco stáli v těsných popruzích. Dvě vrstvy listů latexu 0,03 palců byly umístěny okolo krků zvířat, aby vytvořily nerestriktivní vzduchotěsné těsnění. Na zakázku postavený 11-1 hlavový dóm, který je podobný těm, které jsou popsány Allen a kol. (J. Appl. Toxicol 1995; 15:13-17), byl umístěn přes hlavy psů a připevněn k

popruhu. Proud vzduchu byl vyčerpán za pomoci transvektoru, který byl umístěn na vyčerpávací straně dómu. Jelikož byla helma vzduchotěsná a krk byl upevněn, tak toto tvořilo systém expozice omezené pouze na hlavu. Celková velikost toku dómem byla přibližně 7,5 l/min.

Tvorba aerosolu

Aerosoly byly vytvářeny za použití Respigard II nebulizéru s přívodem přibližně 6,5 l/min. Výstup z generátoru tekł přímo do hlavového dómu.

Vzorkování atmosferické koncentrace

Veškeré vzorkování celkových gravimetrických koncentrací bylo provedeno za pomoci za sebou seřazených držáků filtrů, ve kterých byly A/E filtry ze skleněných vláken (Gelman Instruments Co., Ann Arbor, MI). Vzorkování filtrů z komory bylo provedeno za nominální vzorkovací rychlosti o velikosti 1 l/min, kalibrováno přenosným kalibrátorem velikosti proudu vzduchu (Model 830, Sierra Instruments, Carmel Valley, CA). Doba trvání vzorkování byla 15 minut. Analýza velikosti částic byla provedena za pomoci Sierra Model 218K Ambient Cascade Impactor (Anderson Samplers, Inc, Atlanta, GA). Kaskádové vzorkování z komory bylo provedeno za nominální vzorkovací rychlosti o velikosti 3 l/min, kalibrováno přenosným kalibrátorem velikosti proudu vzduchu (Model 830, Sierra Instruments, Carmel Valley, CA). Doba trvání vzorkování byla 31 minut. Filtry se nechaly sušit po dobu přibližně 30 minut před tím, než byly znovu váženy.

Určení dávky

Dávka Val⁸-GLP-1, která byla inhalovaná během 15-ti minutové expozice byla určena následujícím způsobem: hodnota středního minutového dechového objemu (ml) během 15-ti minutové expozice byla vynásobena hodnota doby trvání expozice, čímž se určí hodnota celkového objemu dýchaného vzduchu (l) během inhalační expozice. Tato hodnota byla vynásobena hodnotou koncentrace aerosolu ($\mu\text{g}/\text{l}$) za účelem určení celkové dávky (mg). Inhalovaná dávka ($\mu\text{g}/\text{kg}$) byla spočítána vydělením hodnoty celkové dávky (μg) hodnotou tělesné hmotnosti (kg) zvířete.

Dávka Val⁸-GLP-1, která se usadila v plicích byla určena následujícím způsobem: hodnota inhalované dávky ($\mu\text{g}/\text{kg}$) byla vynásobena 20-ti procenty, čímž se určí odhadovaná dávka, která se usadila v plicích ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Aerosoly s MMEAD v rozmezí od 1 do 2 μm MMAD se usazují v plicích, jak se ukazuje, přibližně s 20 procentní účinností (Schlesinger RB. 1985. Comparative deposition of inhaled aerosols in experimental animals and humans: A review. J. Toxicol. Environ. Health 15:197-214).

Plicní funkce

Všechna zvířata byla vážena ve dnech -5, 0 a 7. Dechové vlastnosti (klidový dechový objem, dechová frekvence a minutový dechový objem) byly monitorovány za použití pneumotachografu velikosti '0', který byl spojený s

výstupem na hlavovém dómu. Signály byly zaznamenávány na počítači PC za použití Buxco XA Data Acquisition Systému (Buxco Electronics, Inc, Sharon, CT). Alespoň 15 minut před začátkem expozice byla zaznamenávána preexpoziční data, po kterých následovalo zaznamenávání dat v 15-ti minutových expozičních periodách. Všechna data byla analyzována jako 5-ti minutové průměry.

Bronchoalveolární laváž

Bronchoalveolární laváž (BAL) byla provedena přibližně 4 hodiny po každém dávkovacím režimu. Zvířata byla uvedena do anestezie za pomoci intravenózní injekce 2 % Brevitalu před provedením bronchoalveolární laváže BAL. Bronchoalveolární laváž byla provedeno za použití pediatrického fiberoptického bronchoskopu (Olympus, model BF, Type 3C10, Lake Success, NY). Hrot bronchoskopu byl zaveden do dýchacích cest 5 až 7 generace spodního laloku. Bronchoalveolární laváže BAL byly střídavě prováděny mezi pravými a levými plicními laloky. Byly odkapány dva 10 ml alikvoty a mírně odděleny. Alikvoty, které byly získané nazpět z tekutiny laváže byly použity k určení celkového počtu leukocytů, celkového počtu červených krvinek, diferenciálního obrazů bílých krvinek, celkové bílkoviny a laktát dehydrogenázy.

Počty buněk a diferenciální počty buněk

Bylo provedeno úplné spočítání krevních buněk v nezředěné tekutině získané z bronchoalveolární laváže za použití Technicon H1 Systému (Technicon Instruments Corporation).

Byly provedeny diferenciální počty buněk bronchoalveolární laváže mikroskopickým vyhodnocením za použití 200 Wright buněčného barvení.

Odběr krve

Za účelem analýzy plazmatické farmakokinetiky Val⁸-GLP-1 bylo odebráno přibližně 2 až 3 ml krve do EDTA vakuolizovaných zkumavek z vena cefalica nebo vena jugularis předtím, než byla provedena expozice a v časových intervalech 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 a 12 hodin po expozici. Za účelem získání plazmy byla každá zkumavka podrobena centrifugací při rychlosti přibližně 3000 otáček za minutu po dobu 10 minut při teplotě 10°C. Vzorky plazmy byly skladované při teplotě -70°C, dokud nebyly použity k rozboru.

Koncentrační expozice/velikost částic a plicní dávka

Průměrná koncentrace expozice pro každého psa, který byl exponován Val⁸-GLP-1, byla v rozmezí od 64,0 do 101,3 µg/l. Střední hodnota (\pm standardní odchylka) koncentrace pro všechna zvířata byla $77,2 \pm 36,9$ µg/l. Velikost částic byla měřena jako ekvivalent středního hmotnostního aerodynamického průměru ("mass median equivalent aerodynamic diameter" - MMAED) o velikosti 0,91 µm s geometrickou standardní odchylkou (GSD) velikosti 2,37.

Průměrná dávka Val⁸-GLP-1, která se usadila v plicích 6 psů, na které bylo působeno Val⁸-GLP-1, byla spočítaná jako 240 ± 42 µg/kg (střední hodnota \pm standardní odchylka).

Střední inhalovaná dávka (která vstoupila do cest dýchacích se zanedbáním usazení) byla $1198 \pm 208 \mu\text{g/kg}$ (střední hodnota \pm standardní odchylka). Jednotlivá data, která se týkají zvířat jsou uvedena v níže uvedené tabulce.

Odhadovaná plicní dávka u zvířat, která byla exponovaná aerosolům Val⁸-GLP-1

Číslo zvířete	Koncentrace aerosolu ($\mu\text{g/l}$)	Střední minutový objem (ml)	Inhalovaná dávka v plicích ($\mu\text{g/kg}$)	Uložená dávka v plicích ($\mu\text{g/kg}$)
27682	0,07717*	8406	1060	212
27684	0,07717*	9563	1030	206
27685	0,10133	7260	1350	270
27686	0,06400	12733	1360	272
27687	0,06733	9214	950	190
27689	0,07600	11890	1400	288

* Koncentrace aerosolu nebyla určena v případě zvířat 27682 a 27684, z tohoto důvodu byla použita střední koncentrace aerosolu pro výpočet odhadované inhalované plicní dávky ($\mu\text{g/kg}$).

Nebyly pozorované žádné významné změny v tělesné hmotnosti během léčebné fáze. Úvodní (den -5) tělesné hmotnosti byly $9,5 \pm 0,9$ (střední hodnota \pm standardní odchylka; $n=6$) a konečné (den 7) tělesné hmotnosti byly $9,7 \pm 0,9$ kg. Nebyly pozorované žádné významné změny dechové frekvence. Bylo změřeno mírné zvýšení klidového dechového objemu a minutového dechového objemu, ale data byla velice variabilní potenciálně z důvodu příliš krátkého časového

úseku pro navyknutí před začátkem studie. Jednotlivá data, která se týkají zvířat jsou uvedena v níže uvedené tabulce.

Změny plicních funkcí během expozice Val⁸-GLP-1

Číslo zvířete	Objem plic (ml)			Frekvence dýchání (bpm)			Minutový objem (ml/min)		
	5*	10*	15*	5*	10*	15*	5*	10*	15*
27682	119.0	152.1	105.1	74	86.0	95.7	7265	9360	8592
27684	104.6	99.4	100.8	119.2	118.2	108.7	10300	9117	9272
27685	165.9	178.5	209.6	58.1	49.4	42.5	7938	7465	6377
27686	325.1	586.2	374.4	56.3	33.8	59.4	12200	13300	12700
27687	245.9	221.6	183.1	39.5	45.5	50.5	9288	9573	8781
27689	184.5	367.6	454.0	39.8	46.8	33.3	7271	13400	15000
Střed	190.8	267.6	237.8	64.6	63.3	65.0	9044	10369	10120
Odchylka	82.8	180.7	145.3	29.8	32.2	30.3	1956	2426.1	3141
Střed (počát.)	239.0	2168	207.6**	45.9	51.4	64.4**	8448	8744	8223**
Odchylka (počát.)	161.4	137.2	209.5	12	10.2	32.3	2614	2614	1566

*minut během expozice (hodnoty představují průměry 5-ti minutových úseků)

**střední hodnota spočítaná z n=5 (na místo n=6), protože u zvířata nebyla zaznamenána žádná hodnota zvířete #27689 v čase 15 minut před expozicí

Srovnání farmakokinetiky po podkožním a plicním podáním Val⁸-GLP-1

Cesta podávání	C _{max} (ng/ml)	T _{max} (h)	AUC _{0-t} ⁽¹⁾ (mg*h/ml)	T _{1/2} (α) (hodin)
Subkutánní	10.53±1.06	0.71±0.14	36.37±2.18	1.26±0.11
Inhalace	8.66±0.90	1.54±0.59	35.21±5.91	1.19±0.11

*Všechny uvedené hodnoty jsou střední hodnoty ± standardní odchylka od střední hodnoty.

(1) AUC_{0-t} = plocha pod křivkou plazmatické koncentrace od času 0 do času t, kde t=12 hodiny po dávce

Plazmatické koncentrace imunoreaktivního Val⁸-GLP-1 (Tabulka 3) byly měřeny za pomoci kompetitivního radioimunologického testu (RIA). Absorbce Val⁸-GLP-1 cestou obou podání se zdála být rychlá, s dosažením značných plazmatických koncentrací v čase 25 minut po podání. Profily plazmatických časů byly podobné u podkožních injekcí a inhalace. Hodnota průměrného T_{max} pro inhalaci byla vyšší než pro podkožní injekci. Ukazovalo se, že zvýšená plazmatická koncentrace Val⁸-GLP-1 (blízká C_{max}), která byla dosažena inhalační cestou setrvala blízko této hladiny během delší časový úsek než po podkožní injekci.

Na základě průměrných AUC hodnot byla biologická dostupnost inhalovaného Val⁸-GLP-1 (průměrná inhalovaná dávka o velikosti 1198 µg/kg) v porovnání s podkožní injekcí (100 µg/kg) přibližně 7,7 %. Na základě velikosti dávky, která

se usadila v plicích, která byla odhadovaná na 240 µg/kg, byla biologická dostupnost v porovnání s podkožní injekcí 40 %.

Zastupuje:

dr. O. Švorčík

05.02.02
PV 2001-690
~~10188~~

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vybraného ze souboru, který zahrnuje molekuly GLP-1, GLP-1 analogy a/nebo deriváty GLP-1, pro přípravu léčiva pro podávání plicní cestou k léčení hyperglykémie a diabetu.
2. Použití podle nároku 1 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že molekula GLP-1 je vybrána ze skupiny, která sestává z GLP-1 analogů a derivátů GLP-1.
3. Použití podle nároku 2 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že molekula GLP-1 je analogem GLP-1.
4. Použití podle nároku 3 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že analog GLP-1 je vybrán ze souboru, sestávajícího z Val⁸-GLP-1(7-37)OH, Gly⁸-GLP-1 (7-37) OH a Asp⁸-GLP-1 (7-37) OH.
5. Použití podle nároku 4 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že analog GLP-1 je Val⁸-GLP-1 (7-37) OH.
6. Použití podle nároku 4 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že analog GLP-1 je Gly⁸-GLP-1 (7-37) OH.

7. Použití podle nároku 1 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že se molekula GLP-1 je podávána do nižších cest dýchacích pacienta.
8. Použití podle nároku 7 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že se molekula GLP-1 usadí v alveolech.
9. Použití podle nároku 1 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že molekula GLP-1 je inhalovaná ústy pacienta.
10. Použití podle nároku 1 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že farmaceutický přípravek sestává z molekuly GLP-1 ve farmaceuticky přijatelném nosiči.
11. Použití podle nároku 10 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že přípravek je vybrán ze souboru, sestávajícího z roztoku ve vodném médiu a suspenze v jiném než vodném médiu.
12. Použití podle nároku 11 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1 vyznačující se tím, že přípravek je ve formě aerosolu.
13. Použití podle nároku 10 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že přípravek je ve formě suchého prášku.

14. Použití podle nároku 10 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že velikost částice molekuly GLP-1 je menší než 10 mikronů MMAD.

15. Použití podle nároku 14 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že velikost částice molekuly GLP-1 je od 1 do 5 mikronů MMAD.

16. Použití podle nároku 15 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že velikost částice molekuly GLP-1 je od 2 do 3 mikronů MMAD.

17. Použití podle nároku 1 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že alespoň 10 % molekuly GLP-1 se usadí v plicích.

18. Použití podle nároku 1 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že GLP-1 je podáván z inhalačního zařízení, které je vhodné pro plicní podání a schopné podání molekuly GLP-1 do plic pacienta.

19. Použití podle nároku 18 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že zařízení je vybráno ze souboru sestávajícího z nebulizéru, inhalátoru měřených dávek, inhalátoru suchého prášku a spreje.

20. Použití podle nároku 19 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že zařízení je inhalátor suchého prášku.
21. Použití podle nároku 18 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že se podává od 40 μg do 4000 μg molekuly GLP-1.
22. Použití podle nároku 18 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že se podává od 80 μg do 2000 μg molekuly GLP-1.
23. Použití podle nároku 18 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že se podává od 160 μg do 1000 μg molekuly GLP-1.
24. Použití podle nároku 18 molekuly glukagonu podobného peptidu GLP-1, vyznačující se tím, že se podává od 320 μg do 500 μg molekuly GLP-1.

Zastupuje:

dr. O. Švorčík

Seznam sekvencí

<110> Eli Lilly and Company

<120> Způsob podávání inzulinotropních peptidů

<130> X-12013

<140>

<141>

<150> US 60/098273

<151> 1998-08-28

<160> 4

<170> PatentIn. Ver. 2.0

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetická sekvence

<220>

<223> Xaa v poloze aminokyselinového řetězce 1 je vybrán ze souboru, sestávajícího z Ala, Gly, Val, Thr, Ile a alfa-metyl-Ala

29.05.01
PV 2001-690

<220>

<223> Xaa v poloze aminokyselinového řetězce 14 je vybrán ze souboru, sestávajícího z Glu, Gln, Ala, Thr, Ser a Gly

<220>

<223> Xaa v poloze aminokyselinového řetězce 20 je vybrán ze souboru, sestávajícího z Glu, Gln, Ala, Thr, Ser a Gly

<400> 1

Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Xaa	Gly
1				5				10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Xaa	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	
			20					25						

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetická sekvence

<220>

<223> Xaa v poloze 28 je vybrán ze souboru, sestávajícího z Lys and Lys-Gly

<400> 2

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu
1				5				10					15	
Gly	Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Xaa		
				20				25						

29.05.01
PV 2001 - B90

<210> 3

<211> 29

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Xaa v poloze 19 je vybrán ze souboru, sestávajícího z
Lys and Arg

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetická sekvence

<400> 3

Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15
Gln	Ala	Ala	Xaa	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	
				20					25					

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: syntetická nebo semi-syntetická sekvence

<400> 4

His	Val	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser-Tyr	Leu	Glu	
1				5					10				15	
Gly	Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
				20					25					30
Gly														
31														