

Предшествующий уровень техники

Ожирение и ассоциированные с ним нарушения представляют собой распространенные и очень серьезные проблемы общественного здравоохранения в Соединенных Штатах и во всем мире. Ожирение верхней части тела является наиболее известным фактором риска сахарного диабета типа 2 и существенным фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний. Ожирение является признанным фактором риска гипертонии, атеросклероза, застойной сердечной недостаточности, инсульта, заболевания желчного пузыря, остеоартрита, апноэ во сне, репродуктивных нарушений, таких как синдром поликистоза яичников, онкологических заболеваний груди, простаты и толстой кишки, и учащения осложнений общей анестезии. Оно снижает продолжительность жизни и создает серьезный риск заболеваний, сопутствующих вышеуказанным, а также таких нарушений, как инфекции, варикозные вены, акантокератодермия, экзема, непереносимость физических нагрузок, резистентность к инсулину, гипертоническая гиперхолестеринемия, желчекаменная болезнь, ортопедические повреждения и тромбозомболическое заболевание. Ожирение является также фактором риска группы состояний, которую называют синдромом резистентности к инсулину или "Синдромом X".

Было показано, что определенные пептиды, которые связываются с Y2-рецептором, при периферическом введении млекопитающему индуцируют потерю массы. Пептидами, связывающимися с Y2-рецептором, являются нейропептиды, которые связываются с Y2-рецептором. Нейропептиды представляют собой малые пептиды, происходящие из больших белков-предшественников, синтезируемых пептидергическими нейронами и эндокринными/паракринными клетками. Часто предшественники содержат многочисленные биологически активные пептиды. В мозге существует большое разнообразие нейропептидов, вызванное альтернативным сплайсингом первичных генных транскриптов и дифференциальным процессингом предшественников. Рецепторы нейропептидов служат для дискриминации между лигандами и для активации надлежащих сигналов. Пептиды, связывающиеся с Y2-рецепторами, принадлежат к семейству пептидов, включающему в себя пептид YY (PYY), нейропептид Y (NPY) и панкреатический пептид (PP).

NPY представляет собой пептид из 36 аминокислот и наиболее обильным нейропептидом из идентифицированных в мозге млекопитающих. NPY является важным регулятором, как в центральной, так и в периферической нервных системах и влияет на разнообразные физиологические параметры, включая влияние на психомоторную активность, потребление пищи, центральную эндокринную секрецию и вазоактивность в сердечно-сосудистой системе. Высокие концентрации NPY обнаружены в симпатических нервах, снабжающих коронарную, церебральную и почечную сосудистые системы и вносящих вклад в вазоконстрикцию. Сайты связывания NPY были идентифицированы в разных тканях, в том числе в селезенке, кишечных мембранах, мозге, гладких мышцах аорты, почках, семенниках и плаценте.

Фармакологию рецепторов нейропептида Y (NPY) в настоящее время определяют структурно-функциональные отношения в пределах семейства панкреатического полипептида. Это семейство включает в себя NPY, который синтезируется главным образом в нейронах; PYY, который синтезируется главным образом эндокринными клетками в кишечнике, и PP, который синтезируется главным образом эндокринными клетками в поджелудочной железе. Эти пептиды, состоящие из приблизительно 36 аминокислот, имеют компактную спиральную структуру, содержащую "PP-складку" в середине пептида. Специфические особенности включают в себя полипролиновую спираль, состоящую из остатков 1-8, бета-поворот, состоящий из остатков 9-14, альфа-спираль, состоящую из остатков 15-30, и выступающий наружу С-конец, состоящий из остатков 30-36, и карбоксиконцевой амид, который считают критическим для биологической активности. Эти пептиды были использованы для определения по меньшей мере пяти подтипов рецепторов, известных как Y1, Y2, Y3, Y4 и Y5. В распознавании Y1-рецептора пептидом NPY участвуют как N-, так и С-концевые области пептида; замена Gln³⁴ на Pro³⁴ переносится довольно хорошо. Распознавание Y2-рецептора пептидом NPY зависит, главным образом, от четырех С-концевых остатков пептида (Arg³³ - Gln³⁴ - Arg³⁵ - Tyr³⁶ -NH₂), которым предшествует амфипатическая альфа-спираль; замена Gln³⁴ на Pro³⁴ не является хорошо переносимой. Одной из ключевых фармакологических особенностей, которые различают Y1 и Y2, является тот факт, что Y2-рецептор (а не Y1-рецептор) имеет высокое сродство к карбоксиконцевому фрагменту пептида NPY, NPY-(13-36) и к фрагменту PYY22-36 пептида PYY.

Было показано, что пептид, состоящий из 36 аминокислот, названный пептидом YY(1-36) [PYY(1-36)] [YRIKPEAPGEDASPEELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY, SEQ ID№: 1], при введении индивиду путем периферической инъекции вызывает потерю массы и, таким образом, его можно использовать в качестве лекарственного средства для лечения ожирения и связанных с ним заболеваний, Morley, J. Neuropsychobiology 21: 22-30 (1989). Позже было обнаружено, что для получения этого эффекта PYY связывается с Y2-рецептором и что связывание Y2-агониста с Y2-рецептором вызывает снижение потребления углеводов, белков и количества пищи, Leibowitz, S.F. et al. Peptides, 12:1251-1260 (1991). Альтернативной молекулярной формой PYY является PYY(3-36) IKPEAPGEDASPEELNRYYYASLRHYLNLVTRQRY [SEQ ID №: 2], Eberlein, Eysselein et al. Peptides 10: 797-803, 1989. Этот фрагмент составляет приблизительно 40% суммарной PYY-подобной иммунореактивности в кишечных экстрактах человека и собаки и приблизительно от 36% суммарной иммунореактивности PYY в плазме натошак до показателя, несколько больше-

го, чем 50% после приема пищи. Он, видимо, является продуктом расщепления РУУ дипептидилпептидазой-IV (DPP4). Сообщается, что РУУ3-36 является селективным лигандом Y2- и Y5-рецепторов, которые оказываются фармакологически уникальными в своем предпочтении усеченных по N-концу (то есть, C-концевых фрагментов) аналогов NPY. Также было показано, что фрагмент РУУ, имеющий только остатки 22-36, все равно связывается с Y2-рецептором. Однако, если любая часть карбоксиконца этого пептида отщеплена, пептид теряет способность связываться с Y2-рецептором. Таким образом, РУУ-агонистом является пептид, который имеет частичную последовательность полноразмерного РУУ и способен связываться с Y2-рецептором в аркуатном ядре гипоталамуса. Здесь и далее термин "РРУ" относится к полноразмерному РРУ и любому фрагменту РРУ, связывающемуся с рецептором Y2.

Известно, что РУУ и РУУ3-36 можно вводить внутривенной инфузией или инъекцией для лечения угрожающей жизни гипотонии, которая случается при шоке, особенно вызванном эндотоксинами (патент США № 4839343), для ингибирования пролиферации панкреатических опухолей у млекопитающих при перфузии, парентеральном, внутривенном или подкожном введении и при имплантации (патент США № 5574010), для лечения ожирения (Morley, J. Neuropsychobiology 21:22-30 (1989) и заявка на патент США № 20020141985). Также заявлено, что РУУ можно вводить парентеральным, пероральным, интраназальным, ректальным и местным путями субъектам, представляющим собой домашнее животное или человека, в количестве, эффективном для увеличения прибавления массы вышеуказанного субъекта путем усиления желудочно-кишечной абсорбции натрийзависимого котранспортируемого питательного вещества (патент США № 5912227). Однако для лечения ожирения и связанных с ним заболеваний, в том числе диабета, способ введения был ограничен внутривенной инфузией при отсутствии эффективных препаратов, оптимизированных для альтернативного введения РУУ3-36. Ни одна из этих методик по прежнему уровню техники не обеспечивает составов, которые содержат РУУ или РУУ(3-36) в комбинации с наполнителями, предназначенными для усиления доставки через слизистые оболочки (то есть, интраназальной, защечной, пероральной доставки), а также не описывает значение не содержащих эндотоксин препаратов пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, для неинфузионного введения. Таким образом, имеется необходимость в разработке препаратов и способов для введения РУУ3-36.

Краткое описание изобретения

Данное изобретение отвечает вышеуказанным потребностям и удовлетворяет дополнительным целям и обеспечивает преимущества предоставлением новых эффективных способов и композиций для доставки через слизистые, особенно через нос (интраназально), пептидов, связывающихся с Y2-рецепторами, таких как РУУ, панкреатический пептид (РР) и NPY, для лечения ожирения и для индукции сытости у индивида с целью способствовать потере массы у этого индивида и предотвращать или излечивать диабет. В определенных аспектах этого изобретения пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, доставляют в препаратах в слизистую носовой полости так, что он может увеличивать концентрацию пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, по меньшей мере на 5 пикомолей, предпочтительно по меньшей мере на 10 пикомолей, в плазме крови млекопитающего, при интраназальном введении дозы препарата агониста Y2-рецептора. Более того, предпочтительные препараты должны быть способными повышать концентрацию пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в плазме млекопитающего на 10 пикомолей, предпочтительно на 20 пикомолей, при интраназальном введении пептида, связывающегося с Y2-рецептором. При интраназальном введении 150 мкг предпочтительного препарата он должен повысить концентрацию агониста Y2-рецептора в плазме млекопитающего по меньшей мере на 40 пикомолей в литре плазмы. При интраназальном введении 200 мкг пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, препараты по данному изобретению индуцируют увеличение количества пептида, связывающегося с Y2-рецепторами по меньшей мере на 80 пикомолей в литре плазмы.

Предпочтительно пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, является пептидом РР, РУУ или NPY, а млекопитающим является человек. В наиболее предпочтительном варианте осуществления пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, является пептидом РУУ, предпочтительно РУУ(3-36), а млекопитающим является человек.

Данное изобретение также относится к препарату пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, который способен повышать концентрацию пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в плазме крови млекопитающего по меньшей мере на 5 пМ, при введении млекопитающему дозы, содержащей по меньшей мере 50 мкг пептида, связывающегося с Y2-рецепторами.

Данное изобретение также относится к препарату пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, который способен повышать концентрацию пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в плазме крови млекопитающего по меньшей мере на 20 пМ, при введении млекопитающему дозы, содержащей по меньшей мере 100 мкг пептида, связывающегося с Y2-рецепторами.

Данное изобретение также относится к препарату пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, который при интраназальном введении млекопитающему способен повышать концентрацию пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в плазме крови млекопитающего по меньшей мере на 30 пМ, при введении дозы, содержащей по меньшей мере 150 мкг пептида, связывающегося с Y2-рецепторами. Предпочтительно млекопитающим является человек.

Данное изобретение также относится к препарату пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, который при интраназальном введении млекопитающему способен повышать концентрацию пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в плазме крови млекопитающего по меньшей мере на 60 пМ, при введении дозы, содержащей по меньшей мере 200 мкг пептида, связывающегося с Y2-рецепторами. Предпочтительно млекопитающим является человек.

Данное изобретение также направлено на интраназальный препарат агониста Y2-рецептора, являющийся по существу свободным от белков или полипептидов, стабилизирующих этот препарат. В частности, предпочтительный препарат свободен от таких белков, как альбумин и образованные из коллагена белки, такие как желатин.

В других аспектах данного изобретения препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, для доставки через слизистые содержит пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, воду и солюбилизирующий агент, имеющий рН от 3 до 6,5. В предпочтительном варианте осуществления солюбилизирующим агентом является циклодекстрин.

В другом варианте осуществления данного изобретения препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, для доставки через слизистые оболочки содержит пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, воду, солюбилизирующий агент, предпочтительно циклодекстрин, и по меньшей мере один полиол, предпочтительно 2 полиола. В альтернативных вариантах осуществления препарат может содержать одно или все из нижеследующего: хелатирующий агент, поверхностно-активный агент и забуферивающий агент.

В другом варианте осуществления данного изобретения препарат содержит пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, воду, хелатирующий агент и солюбилизирующий агент.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения препарат содержит пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, воду и хелатирующий агент, имеющий рН от 3 до 6,5.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения препарат содержит пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, воду, хелатирующий агент и по меньшей мере один полиол, предпочтительно два полиола. Согласно дополнительным вариантам осуществления препараты могут включать в себя один или несколько из нижеследующих агентов: поверхностно-активный агент, солюбилизирующий агент и забуферивающий агент.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения препарат содержит пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, воду и по меньшей мере два полиола, такие как лактоза и сорбит. Дополнительные агенты, которые можно добавлять к препарату, включают в себя, без ограничения, солюбилизирующий агент, хелатирующий агент, один или более забуферивающих агентов и поверхностно-активный агент.

Усиление интраназальной доставки агониста пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в соответствии со способами и композициями по этому изобретению делает возможным эффективное фармацевтическое применение этих агентов для лечения множества разных заболеваний и состояний у млекопитающих.

Данное изобретение отвечает этой потребности, делая возможным жидкий или обезвоженный препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, причем этот препарат по существу свободен от стабилизатора, являющегося полипептидом или белком. Жидкий препарат РУУ содержит воду, РУУ и по меньшей мере одну из нижеследующих добавок, выбранных из группы, состоящей из полиолов, поверхностно-активных агентов, солюбилизирующих агентов и хелатирующих агентов. Величина рН препарата предпочтительно составляет приблизительно от 3 до 7,0, предпочтительно приблизительно от 4,5 до 6,0, наиболее предпочтительно около $5,0 \pm 0,03$.

Еще одним вариантом осуществления данного изобретения является водный препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, по данному изобретению, содержащий воду, пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, полиол и поверхностно-активный агент, причем этот препарат имеет рН приблизительно от 3 до 6,5 и, по существу, свободен от стабилизатора, являющегося белком или полипептидом.

Еще одним вариантом осуществления данного изобретения является водный препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, содержащий воду, пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, полиол и солюбилизирующий агент, причем этот препарат имеет рН приблизительно от 3,0 до 6,5 и, по существу, свободен от стабилизатора, который является белком или полипептидом.

Еще одним вариантом осуществления данного изобретения является водный препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, содержащий воду, пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, солюбилизирующий агент и поверхностно-активный агент, причем этот препарат имеет рН приблизительно от 3,0 до 6,5 и по существу свободен от стабилизатора, который является белком или полипептидом.

Другим вариантом осуществления этого изобретения является водный препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, содержащий воду, пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, солюбилизирующий агент, полиол и поверхностно-активный агент, причем этот препарат имеет рН приблизительно от 3,0 до 6,5 и по существу свободен от стабилизатора, который является белком или полипептидом.

В другом аспекте данного изобретения стабильный водный препарат обезвоживают с получением обезвоженного препарата пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, причем этот препарат содержит

пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, и, по меньшей мере, одну из нижеследующих добавок, выбираемых из группы, состоящей из полиолов, поверхностно-активных агентов, солюбилизирующих агентов и хелатирующих агентов, причем вышеуказанный обезвоженный препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, по существу свободен от стабилизатора, который является белком или полипептидом, таким как альбумин, коллаген или произведенный из коллагена белок, такой как желатин. Обезвоживание может быть достигнуто различными способами, такими как лиофилизация, распылительная сушка, индуцированная солью преципитация и сушка, вакуумная сушка, роторное выпаривание или преципитация сверхкритическим CO₂.

В одном варианте осуществления обезвоженный пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, содержит пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, полиол и солюбилизирующий агент, причем этот препарат по существу свободен от стабилизатора, которым является белок.

В другом варианте осуществления обезвоженный препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, содержит пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, полиол и поверхностно-активный агент, причем препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, по существу, свободен от стабилизатора, который является белком или полипептидом.

В другом варианте осуществления обезвоженный препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, содержит пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, поверхностно-активный агент и солюбилизирующий агент, причем препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, по существу свободен от стабилизатора, которым является белок или полипептид.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения обезвоженный препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, содержит пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, полиол, поверхностно-активный агент и солюбилизирующий агент, причем препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, по существу свободен от стабилизатора, который является белком или полипептидом.

Можно использовать любой солюбилизирующий агент, но предпочтительный агент выбирают из группы, которую составляют гидроксипропил-β-циклодекстран, сульф-бутиловый эфир β-циклодекстрана, метил-β-циклодекстрин и хитозан.

Вообще, полиол выбирают из группы, состоящей из лактозы, сорбита, трегалозы, сахарозы, маннозы и мальтозы и их производных и гомологов.

Подходящий поверхностно-активный агент выбирают из группы, состоящей из L-α-фосфатидилхолиндидеканоила (DDPC), полисорбата 20 (Tween 20), полисорбата 80 (Tween 80), полиэтиленгликоля (ПЭГ), цетилового спирта, поливинилпирролидона (PVP), поливинилового спирта (PVA), ланолинового спирта и сорбитанмоноолеата.

В предпочтительном препарате препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, также содержит хелатирующий агент, такой как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) или этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА). Также к препарату можно добавлять консервант, такой как хлорбутанол или хлорид бензалкония для ингибирования микробного роста. pH обычно регулируют при использовании буфера, такого как цитрат натрия с лимонной кислотой и ацетат натрия с уксусной кислотой. Альтернативным буфером может быть уксусная кислота с ацетатом натрия или янтарная кислота с гидроксидом натрия.

Предпочтительными пептидами, связывающимися с Y2-рецепторами, являются пептиды RYY, RP или NPY, предпочтительно пептид RYY(3-36).

Данное изобретение также предусматривает препарат, в котором концентрация пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, составляет от 0,1 до 15,0 мг/мл, предпочтительно от 1,0 до 2 мг/мл, и величина pH водного раствора составляет от 3,0 до 6,5, предпочтительно около 5,0 ± 0,3.

Данное изобретение дополнительно включает в себя препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, причем концентрация полиола находится между 0,1 и 10% (масса/объем) и, дополнительно, концентрация полиола находится в диапазоне приблизительно от 0,1 до 3% (масса/объем).

Данное изобретение также включает в себя препарат, в котором концентрация поверхностно-активного агента находится приблизительно между 0,00001 и 5% (масса/объем), причем концентрация поверхностно-активного агента находится приблизительно между 0,0002 и 0,1% (масса/объем).

Это изобретение также включает в себя препарат, в котором концентрация солюбилизирующего агента составляет от 1 до 10% (масса/объем), причем концентрация солюбилизирующего агента составляет от 2 до 5% (масса/объем).

Готовый раствор можно фильтровать, подвергать сублимационной сушке, лиофилизировать при использовании способов, хорошо известных обычному специалисту в данной области, и следуя инструкциям изготовителя лиофилизирующего оборудования. Таким образом получают обезвоженный препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, по существу свободный от стабилизатора, который является белком.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, содержит пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, и фармацевтически приемлемый носитель, причем препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, имеет по меньшей мере на 1%,

предпочтительно на 3% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 6% более высокую проникающую способность в анализе проникновения в ткань *in vitro*, чем контрольный препарат, состоящий из воды, хлорида натрия, буфера и пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, при определении анализом трансэпителиального электрического сопротивления, описанным в примерах 2 и 7. В предпочтительном варианте осуществления препарат, связывающийся с Y2 рецепторами, дополнительно содержит по меньшей мере один наполнитель, выбранный из группы, состоящей из поверхностно-активного агента, солюбилизирующего агента, полиола и хелатирующего агента. Предпочтительно пептидом, связывающимся с Y2-рецепторами, является пептид RYY, пептид NPY или пептид PP.

В еще одном варианте осуществления данного изобретения предложен препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, который способен повышать концентрацию пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в плазме млекопитающего по меньшей мере на 5, предпочтительно на 10, 20 40, 60, 80 или более пикомолей в литре плазмы, при интраназальном введении вышеуказанному млекопитающему 100 мкл препарата.

В вариантах осуществления, являющихся примерами, способствующие доставке способы и композиции по данному изобретению обеспечивают терапевтически эффективную доставку агониста пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, через слизистые оболочки для предотвращения или лечения ожирения и нарушений питания у млекопитающих. В одном аспекте этого изобретения предложены фармацевтические препараты, подходящие для введения через нос, которые содержат терапевтически эффективное количество пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и один или более агентов, способствующих интраназальной доставке, описанных здесь, причем эти препараты эффективны в способе интраназальной доставки через слизистые оболочки по этому изобретению для предотвращения начала или прогрессии ожирения или нарушений питания у млекопитающего. Доставка, осуществляемая через слизистые оболочки носовой полости, терапевтически эффективного количества агониста пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и одного или нескольких из агентов, способствующих интраназальной доставке, приводит к повышению терапевтических уровней агониста пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в субъекте и ингибирует потребление пищи у млекопитающего, что снижает симптомы ожирения или нарушения питания.

Способствующие доставке способы и композиции по данному изобретению обеспечивают терапевтически эффективную доставку, осуществляемую через слизистые, пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, для предотвращения или лечения множества разных заболеваний и состояний у субъектов, представляющих собой млекопитающее. Пептиды, связывающиеся с Y2-рецепторами, можно вводить множеством разных путей доставки через слизистые, например приведением пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в контакт с эпителием слизистых оболочек носовой полости, эпителием слизистых оболочек бронхов или легких, щечной поверхностью полости рта или с поверхностью слизистых оболочек полости рта и тонкого кишечника. В вариантах осуществления, являющихся примерами, способы и композиции предназначены или составлены для интраназальной доставки (например, доставки через слизистые оболочки носовой полости или интраназальной доставки через слизистые оболочки).

В одном аспекте этого изобретения предложены фармацевтические препараты, подходящие для интраназального введения, содержащие терапевтически эффективное количество агониста пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и один или несколько агентов, способствующих интраназальной доставке, описанных здесь, причем эти препараты эффективны в способе доставки через слизистые оболочки носовой полости по этому изобретению для предотвращения начала или прогрессии ожирения, диабета, рака, или недостаточного питания или похудения, связанных с онкологическим заболеванием, у субъекта, представляющего собой млекопитающее, или для облегчения одного или нескольких из хорошо клинически распознаваемых симптомов ожирения, а также для лечения болезни Альцгеймера, карциномы толстой кишки, аденокарциномы толстой кишки, панкреатической карциномы, панкреатической аденокарциномы, карциномы груди.

В другом аспекте этого изобретения фармацевтические препараты и способы направлены на введение агониста пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в комбинации с сукцинатом витамина Е. Агонист пептида, связывающийся с Y2-рецепторами, в комбинации с сукцинатом витамина Е можно вводить для облегчения симптомов или предотвращения начала или снижения частоты и тяжести рака, например, аденокарциномы толстой кишки, панкреатической аденокарциномы или рака груди.

В другом аспекте этого изобретения неожиданно было обнаружено, что применение свободных от эндотоксина пептидов, связывающихся с Y2-рецепторами, например RYY(3-36), дает увеличение доставки через слизистые при сравнении с пептидами, у которых эндотоксин не удален. Применение свободных от эндотоксина пептидов, связывающихся с Y2-рецепторами, в фармацевтических препаратах слало возможным введение неинфузионными путями, включающими в себя доставку через слизистые оболочки носа, рта, легких, влагалища, прямой кишки и тому подобные.

Вышеуказанные препараты пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, для доставки, осуществляемой через слизистые оболочки, и способы получения и способы доставки по этому изобретению обеспечивают улучшенную доставку через слизистые оболочки пептидов, связывающихся с Y2-рецепторами, субъектам, представляющим собой млекопитающее. Эти композиции и способы могут

включать в себя комбинационный препарат или координированное введение одного или нескольких из пептидов, связывающихся с Y2-рецепторами, с одним или несколькими из агентов, способствующих доставке через слизистые оболочки. К агентам, способствующим доставке через слизистые оболочки, выбираемым для этих препаратов и способов, относятся: (а) солюбилизирующие агенты; (б) модифицирующие заряд агенты; (в) агенты контроля pH; (г) ингибиторы разлагающих ферментов; (д) муколитические или удаляющие слизь агенты; (е) цилиостатические агенты; (ё) агенты, способствующие проникновению через мембраны (например, (i) поверхностно-активный агент, (ii) соль желчной кислоты, (iii) фосфолипидная или жирнокислотная добавка, смешанная мицелла, липосома или носитель, (iv) енамин, (v) соединение, являющееся донором NO, (vi) длинноцепочечная амфипатическая молекула (vii) малый гидрофобный агент, способствующий проникновению; (viii) производное натрия или салициловой кислоты; (ix) глицериновый эфир ацетоуксусной кислоты (x) производное циклодекстрина или бета-циклодекстрина, (xi) жирная кислота с цепью средней длины, (xii) хелатирующий агент, (xiii) аминокислота или ее соль, (xiv) N-ацетиламинокислота или ее соль, (xv) фермент, разлагающий выбранный компонент мембраны, (xvi) ингибитор синтеза жирных кислот, (xvii) ингибитор синтеза холестерина; или (xviii) любая комбинация агентов, способствующих проникновению через мембраны по (i)-(xvii)); (ж) агенты, модулирующие физиологию эпителиальных стыков, такие как стимуляторы оксида азота (NO), хитозан и производные хитозана; (з) вазодилаторные агенты; (и) агенты, способствующие селективному транспорту; и (к) стабилизирующие средства доставки, носители, вспомогательные агенты или комплексобразующие агенты, с которыми пептид(ы), связывающий(е)ся с Y2-рецепторами, эффективно комбинируются, ассоциируются, содержатся, инкапсулируются или связываются с целью стабилизации активного агента, способствующего доставке через слизистые оболочки.

В различных вариантах осуществления этого изобретения пептид YY комбинируют с одним, двумя, тремя, четырьмя или более агентами, способствующими доставке через слизистые оболочки, указанными в пунктах (а)-(к), выше. Эти агенты, способствующие доставке через слизистые, можно смешивать, по отдельности или вместе, с пептидом YY, или иначе комбинировать с ним в фармацевтически приемлемом препарате или средстве доставки. Препарат пептида YY с одним или более чем одним из агентов, способствующих доставке через слизистые, в соответствии с данным здесь описанием (как вариант, включающий в себя любую комбинацию двух или более агентов, способствующих доставке через слизистые, выбираемых из вышеуказанных пунктов (а)-(к)) обеспечивает увеличение биологической доступности пептида YY после его доставки через поверхность слизистых оболочек субъекта, представляющего собой млекопитающее.

Таким образом, данное изобретение представляет собой способ для подавления аппетита, для способствования потере массы, для уменьшения потребления пищи или для лечения ожирения и/или диабета у млекопитающего, причем при этом способе вводят через слизистые оболочки препарат, содержащий пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, так что, когда через слизистые оболочки вводят млекопитающему 50 мкг Y2-рецептора, концентрация пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в плазме млекопитающего увеличивается по меньшей мере на 5 пикомолей, предпочтительно по меньшей мере на 10 пикомолей в литре плазмы. Примеры таких препаратов раскрыты выше.

Данное изобретение дополнительно обеспечивает применение пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, с целью получения медикамента для осуществляемого через слизистые оболочки введения пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, для подавления аппетита, для способствования потере массы, для уменьшения потребления пищи или для лечения ожирения у млекопитающего, причем, когда млекопитающему вводят через слизистые около 50 мкг Y2-рецептора, концентрация пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в плазме млекопитающего увеличивается по меньшей мере на 5 пикомолей в литре плазмы. Когда млекопитающему интраназально вводят 100 мкг пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, концентрация агониста Y2-рецептора увеличивается по меньшей мере на 20 пикомолей в литре плазмы у млекопитающего.

Доза пептида YY в фармацевтических препаратах по данному изобретению, эффективная для доставки через слизистые оболочки, содержит, например, приблизительно от 0,001 до 100 пикомолей на кг массы тела, приблизительно от 0,01 до 10 пикомолей на кг массы тела или приблизительно от 0,1 до 5 пикомолей на кг массы тела. В дополнительных вариантах осуществления, являющихся примерами, дозировка пептида YY находится в пределах приблизительно от 0,5 до 1,0 пикомолей на кг массы тела. В предпочтительном варианте осуществления интраназальная доза должна быть в диапазоне от 50 до 400 мкг, предпочтительно от 100 до 200 мкг, наиболее предпочтительно от 100 до 150 мкг. Фармацевтические препараты по данному изобретению можно вводить один или более раз в день (например, до приема пищи), или 3 раза в неделю, или один раз в неделю в течение срока от одной недели до по меньшей мере 96 недель или даже в течение жизни конкретного пациента или субъекта. В определенных вариантах осуществления фармацевтические препараты по этому изобретению вводят один или более раз в день, два раза в день, четыре раза в день, шесть раз в день или восемь раз в день.

Используют агенты, способствующие интраназальной доставке, которые способствуют доставке пептида YY в или через поверхность слизистых оболочек носовой полости. Для пассивно абсорбируемых лекарственных средств относительный вклад параклеточного и трансклеточного пути в транспорт

лекарственного средства зависит от рКа, коэффициента распределения, молекулярного радиуса и заряда лекарственного средства, pH среды просвета, в который доставляют лекарственное средство, и площади абсорбирующей поверхности. Агент, способствующий интраназальной доставке, по данному изобретению может быть агентом контроля pH. pH фармацевтического препарата по данному изобретению является фактором, влияющим на абсорбцию пептида YY параклеточным и трансклеточным путями транспорта лекарственного средства. В одном варианте осуществления фармацевтический препарат по данному изобретению имеет величину pH, установленную приблизительно между 3,0 и 6,5. В дополнительном варианте осуществления фармацевтический препарат по данному изобретению имеет величину pH, установленную приблизительно между 3,0 и 5,0. В дополнительном варианте осуществления фармацевтический препарат по данному изобретению имеет величину pH, установленную приблизительно между 4,0 и 5,0. Обычно величина pH составляет $5,0 \pm 0,3$.

Краткое описание рисунков

Фиг. 1 показывает стабильность РYУ3-36 при высокой температуре (40°C) при различных pH от 3,0 до 7,4.

Фиг. 2 показывает данные по TEER (трансэпителиальное электрическое сопротивление) у агентов, способствующих проникновению.

Фиг. 3 показывает жизнеспособности клеток с кандидатными препаратами РYУ.

Фиг. 4 показывает цитотоксические эффекты кандидатных препаратов.

На фиг. 2-4:

EN1 - забуференный фосфатами физраствор, pH 5,0;

EN2 - L-аргинин (10% масса/объем);

EN3 - поли-L-аргинин (0,5% масса/объем);

EN4 - гамма-циклодекстрин (1% масса/объем);

EN5 - альфа-циклодекстрин (5% масса/объем);

EN6 - метил-бета-циклодекстрин (3% масса/объем);

EN7 - н-каприновой кислоты натриевая соль (0,075% масса/объем);

EN8 - хитозан (0,5% масса/объем);

EN9 - L-альфа-фосфатидилхолиндидеканоил (3,5% масса/объем);

EN10 - S-нитрозо-M-ацетилпеницилламин, (0,02% масса/объем);

EN11 - пальмитоил-BL-гарнитин (0,5% масса/объем);

EN12 - Pluronic-127 (0,3% масса/объем);

EN13 - натрия нитропруссид (0,3% масса/объем);

EN14 - натрия гликохолат (1% масса/объем).

Фиг. 5 показывает синергические вклады различных компонентов в проникающую способность лекарственного средства. На фиг. 5 EN1 представляет собой DDPC, EN2 представляет собой метил-β-циклодекстрин и EX1 представляет собой EDTA.

Фиг. 6 показывает уровни РYУ3-36 в плазме крыс, квадраты представляют собой дозу 4,1 мкг/кг, треугольник представляет собой дозу 41 мкг/кг и кружки представляют собой дозу 205 мкг/кг.

Фиг. 7 показывает дозовую линейность после интраназального введения РYУ3-36 крысам, выраженную как зависимость $C_{\max}$ - C_{bas} в пг/мл от дозы в мкг/кг.

Фиг. 8 показывает дозовую линейность после интраназального введения РYУ3-36 крысам в виде зависимости площади под кривой (AUC) от дозы в мкг/кг.

Фиг. 9 показывает зависимость средней концентрации РYУ в плазме от времени в минутах у трех человек-добровольцев, каждому из которых ввели 20 мкг РYУ(3-36) через нос.

Фиг. 10 показывает зависимость средней концентрации РYУ в плазме от времени в минутах у трех добровольцев, каждому из которых ввели 50 мкг РYУ(3-36) через нос.

Фиг. 11 показывает зависимость средней концентрации РYУ в плазме от времени в минутах у трех человек-добровольцев, каждому из которых ввели 100 мкг РYУ(3-36) через нос.

Фиг. 12 показывает зависимость средней концентрации РYУ в плазме от времени в минутах у трех человек-добровольцев, каждому из которых ввели 150 мкг РYУ3-36 через нос.

Фиг. 13 показывает зависимость средней концентрации РYУ в плазме от времени в минутах у трех человек-добровольцев, каждому из которых ввели 200 мкг РYУ(3-36) через нос.

Фиг. 14 показывает зависимость концентрации РYУ в плазме в пикомолях/л от времени для пяти групп здоровых людей-добровольцев, которые получали через нос РYУ(3-36). Дозы составляли 200, 150, 100, 50 и 20 мкг РYУ3-36.

Фиг. 15 показывает дозовую линейность, выраженную как зависимость $C_{\max}$ РYУ в пг/мл от дозы РYУ(3-36), введенной людям-добровольцам.

Фиг. 16 показывает дозовую линейность в виде зависимости средней AUC для РYУ в пг/мл от дозы РYУ(3-36), введенной людям-добровольцам.

Фиг. 17 показывает визуальную аналоговую шкалу (VAS) в зависимости от дозы РYУ(3-36), введенной людям-добровольцам. Был задан вопрос: "Насколько вы голодны?" Чем ниже балл, тем менее голодным был индивид по 100-балльной шкале.

Фиг. 18 показывает визуальную аналоговую шкалу (VAS) в зависимости от дозы РYY(3-36), введенной людям-добровольцам. Был задан вопрос: "Сколько вы можете съесть?" Чем ниже балл, тем менее голодным был индивид по 100-балльной шкале.

Фиг. 19 показывает визуальную аналоговую шкалу (VAS) в зависимости от дозы РYY(3-36), введенной людям-добровольцам. Был задан вопрос: "Насколько сытым(ой) вы себя чувствуете?" Чем ниже балл, тем менее сыт индивид по 100-балльной шкале.

Фиг. 20 показывает в процентах проникающую способность РYY(3-36), содержащего эндотоксин, против проникающей способности РYY(3-36), свободного от эндотоксина.

Подробное описание изобретения

Как отмечено выше, данное изобретение предлагает улучшенные способы и композиции для доставки, осуществляемой через слизистые оболочки, пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, субъектам, представляющим собой млекопитающее, для лечения или предотвращения множества разных заболеваний и состояний. Примеры надлежащих субъектов, представляющих собой млекопитающее, для лечения и профилактики в соответствии со способами по этому изобретению включают в себя, без ограничения, людей и приматов, не являющихся людьми, виды домашнего скота, такие как лошади, крупный рогатый скот, овцы и козы, и экспериментальных и домашних животных, в том числе собак, кошек, мышей, крыс, морских свинок и кроликов.

Для лучшего понимания данного изобретения даны нижеследующие определения.

ПЕПТИДЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С Y2-РЕЦЕПТОРОМ

Пептиды, связывающиеся с Y2-рецептором, используемые в препаратах для доставки через слизистые оболочки по данному изобретению, включают в себя семейство панкреатических полипептидов. В данном контексте оно содержит три семейства встречающихся в природе биоактивных пептидов, РР, РPY и РYY. Примеры пептидов, связывающихся с Y2-рецепторами, и их применения раскрыты в патентах США № 5026685; 5574010; 5604203; 5696093; 6046167; в Gehlert et al., Proc Soc Exp Biol Med 218/7-22 (1998); в Sheikh et al. Am J Physiol, 267:701-15(1991); в Fournier et al., Mol Pharmacol 45:93-101 (1994); в Kirby et al., J Med Chem 38:4579-4586 (1995); в Rist et al., Eur J Biochem 247: 1019-1028 (1997); в Kirby et al., J Med Chem 36:3802-3808 (1993); в Grundemar et al., Regulatory Peptides 62: 131-136 (1996); в патентах США № 5696093 (примеры РYY-агонистов), 6046167. В соответствии с данным изобретением пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, включает в себя свободные основания, соли, представляющие собой соли присоединения кислоты или соли металла, такие как соли калия или натрия, или пептиды, представляющие собой пептиды, связывающиеся с Y2-рецепторами, которые были модифицированы такими способами, как амидирование, гликозилирование, ацилирование, сульфатирование, фосфорилирование, ацетилирование и циклизация (патенты США № 6093692 и 6225445) и пэгилирование.

АГОНИСТЫ ПЕПТИДА YY

В данном контексте термин "РYY" относится к РYY(1-36) в формах, представляющих собой нативную последовательность или ее вариант, а также к производным, фрагментам и аналогам РYY из любого источника, будь то натуральные, синтетические или рекомбинантные. РYY должен состоять, по меньшей мере, из последних 15 аминокислотных остатков или их аналогов в последовательности РYY, РYY(22-36) (SEQ ID NO: 3). Другими пептидами РYY, которые можно использовать, являются РYY(1-36) (SEQ ID NO: 1), РYY(3-36) (SEQ ID NO: 2), РYY(4-36) (SEQ ID NO: 4), РYY(5-36) (SEQ ID NO: 5), РYY(6-36) (SEQ ID NO: 6), РYY(7-36) (SEQ ID NO: 7), РYY(8-36) (SEQ ID NO: 8), РYY(9-36) (SEQ ID NO: 9), РYY(10-36) (SEQ ID NO: 10), РYY(11-36) (SEQ ID NO: 11), РYY(12-36) (SEQ ID NO: 12), РYY(13-36) (SEQ ID NO: 13), РYY(14-36) (SEQ ID NO: 14), РYY(15-36) (SEQ ID NO: 15), РYY(16-36) (SEQ ID NO: 16), РYY(17-36) (SEQ ID NO: 17), РYY(18-36) (SEQ ID NO: 18), РYY(19-36) (SEQ ID NO: 19), РYY(20-36) (SEQ ID NO: 20) и РYY(21-36) (SEQ ID NO: 21). Эти пептиды в типичных случаях связываются с Y-рецепторами в мозге и других местах, особенно с Y2- и/или Y5-рецепторами. В типичных случаях эти пептиды синтезируют в свободной от эндотоксина или пирогена форме, хотя это не всегда является необходимым.

Другие пептиды РYY включают в себя пептиды РYY с консервативной аминокислотного остатка, например, сайт-специфической мутацией пептида РYY, в том числе [Asp¹⁵] РYY(15-36) (SEQ ID NO: 90), [Thr¹³] РYY(13-36) (SEQ ID NO: 91), [Val¹²] РYY(12-36) (SEQ ID NO: 92), [Glu¹¹] РYY(11-36) (SEQ ID NO: 93), [Asp¹⁰] РYY(10-36) (SEQ ID NO: 94), [Val⁷] РYY(7-36) (SEQ ID NO: 95), [Asp⁶] РYY(6-36) (SEQ ID NO: 96), [Gln⁴] РYY(4-36) (SEQ ID NO: 97), [Arg⁴] РYY(4-36) (SEQ ID NO: 98), [Asn⁴] РYY(4-36) (SEQ ID NO: 99), [Val³] РYY(3-36) (SEQ ID NO: 100) и [Leu³] РYY(3-36) (SEQ ID NO: 101). Другие пептиды РYY включают в себя пептиды с заменой по меньшей мере двух консервативных аминокислотных остатков, в том числе [Asp¹⁰, Asp¹⁵] РYY(10-36) (SEQ ID NO: 102), [Asp⁶, Thr¹³] РYY(6-36) (SEQ ID NO: 103), [Asn⁴, Asp¹⁵] РYY(4-36) (SEQ ID NO: 104) и [Leu³, Asp¹⁰] РYY(3-36) (SEQ ID NO: 105). Также сюда включены аналоги РYY, например те, что раскрыты в патентах США № 5604203 и 5574010; в Balasubramaniam, et al., Peptide Research 1: 32 (1988); в заявке на Японский патент 2225497 (1990); в Balasubramaniam, et al., Peptides 14:1011, 1993; в Grandt, et al., Reg. Peptides 51: 151, (1994); в Международной заявке PCT 94/03380, в патентах США № 5604203 и 5574010. Эти пептиды в типичных случаях связываются с Y-рецепторами в мозге и других местах, особенно с Y2- и/или Y5-рецепторами. В типичных случаях эти

пептиды синтезируют в свободных от эндотоксина или пирогена формах, хотя это не всегда является необходимым.

РYY-агонисты включают в себя крысиный РYY (SEQ ID NO: 72) и усеченные по аминоконцу формы, соответствующие человеческому РYY, свиной РYY (SEQ ID NO: 73), и усеченные по аминоконцу формы, соответствующие человеческому РYY, и РYY морской свинки (SEQ ID NO: 74), и усеченные по аминоконцу формы, соответствующие человеческому РYY.

В соответствии с данным изобретением пептид РYY также включает в себя свободные основания, соли присоединения кислоты или соли металла, такие как соли калия или натрия этих пептидов, и пептиды РYY, модифицированные такими способами, как амидирование, гликозилирование, ацилирование, сульфатирование, фосфорилирование, ацетилирование, циклизация и другими хорошо известными способами ковалентной модификации. Эти пептиды в типичных случаях связываются с Y-рецепторами в мозге и других местах, особенно с Y2- и/или Y5-рецепторами. В типичных случаях эти пептиды синтезируют в свободных от эндотоксина или пирогена формах, хотя это не всегда является необходимым.

АГОНИСТЫ НЕЙРОПЕПТИДА Y

NPY является еще одним пептидом, связывающимся с Y2-рецепторами. Пептиды NPY включают в себя полноразмерный NPY(1-36) (SEQ ID NO: 22), а также фрагменты NPY(1-36), которые были усечены по аминоконцу. Для эффективного связывания с Y2-рецептором NPY-агонист должен иметь, по меньшей мере, последние 11 аминокислотных остатков при карбоксиконце, то есть должен состоять из NPY(26-36) (SEQ ID NO: 23). Другие примеры NPY-агонистов, которые связываются с Y2-рецептором, представляют собой NPY(3-36) (SEQ ID NO: 24), NPY(4-36) (SEQ ID NO: 25), NPY(5-36) (SEQ ID NO: 26), NPY(6-36) (SEQ ID NO: 27), NPY(7-36) (SEQ ID NO: 28), NPY(8-36) (SEQ ID NO: 29), NPY(9-36) (SEQ ID NO: 30), NPY(10-36) (SEQ ID NO: 31), NPY(11-36) (SEQ ID NO: 32), NPY(12-36) (SEQ ID NO: 33), NPY(13-36) (SEQ ID NO: 34), NPY(14-36) (SEQ ID NO: 35), NPY(15-36) (SEQ ID NO: 36), NPY(16-36) (SEQ ID NO: 37), NPY(17-36) (SEQ ID NO: 38), NPY(18-36) (SEQ ID NO: 39), NPY(19-36) (SEQ ID NO: 40), NPY(20-36) (SEQ ID NO: 41), NPY(21-36) (SEQ ID NO: 42), NPY(22-36) (SEQ ID NO: 43), NPY(23-36) (SEQ ID NO: 44), NPY(24-36) (SEQ ID NO: 45) и NPY(25-36) (SEQ ID NO: 46).

Другие агонисты NPY включают в себя крысиный NPY (SEQ ID NO: 75) и усеченные по аминоконцу формы от NPY(3-36) до NPY(26-36), как в человеческой форме, кроличий NPY (SEQ ID NO: 76) и усеченные по аминоконцу формы от NPY(3-36) до NPY(26-36), как в человеческой форме, собачий NPY (SEQ ID NO: 77) и усеченные по аминоконцу формы от NPY(3-36) до NPY(26-36), как в человеческой форме, свиной NPY (SEQ ID NO: 78) и усеченные по аминоконцу формы от NPY(3-36) до NPY(26-36), как в человеческой форме, коровий NPY (SEQ ID NO: 79) и усеченные по аминоконцу формы от NPY(3-36) до NPY(26-36), как в человеческой форме, овечий NPY (SEQ ID NO: 80) и усеченные по аминоконцу формы от NPY(3-36) до NPY(26-36), как в человеческой форме, и NPY морской свинки (SEQ ID NO: 81) и усеченные по аминоконцу формы от NPY(3-36) до NPY(26-36), как в человеческой форме.

В соответствии с данным изобретением, пептид NPY также включает в себя свободные основания, соли присоединения кислоты или соли металла, такие как соли калия или натрия, этих пептидов и пептиды NPY, которые модифицированы такими способами, как амидирование, гликозилирование, ацилирование, сульфатирование, фосфорилирование, ацетилирование, циклизация и другими известными способами ковалентной модификации. Эти пептиды в типичных случаях связываются с Y-рецепторами в мозге и других местах, особенно с Y2- и/или Y5-рецепторами. В типичных случаях синтезируют эти пептиды в свободных от эндотоксина или пирогена формах, хотя это не всегда является необходимым.

Панкреатический пептид

Панкреатический пептид (PP) и PP-агонист также связываются с Y2-рецептором. Примеры PP-агонистов представляют собой полноразмерный PP(1-36) (SEQ ID NO: 47) и множество фрагментов PP, усеченных по аминоконцу. Для связывания с Y2-рецепторами PP-агонист должен иметь последние 11 аминокислотных остатков при карбоксиконце, PP(26-36), (SEQ ID NO: 48). Примеры других PP, которые связываются с Y2-рецепторами, представляют собой PP(3-36) (SEQ ID NO: 49), PP(4-36) (SEQ ID NO: 50), PP(5-36) (SEQ ID NO: 51), PP(6-36) (SEQ ID NO: 52), PP(7-36) (SEQ ID NO: 53), PP(8-36) (SEQ ID NO: 54), PP(9-36) (SEQ ID NO: 55), PP(10-36) (SEQ ID NO: 56), PP(11-36) (SEQ ID NO: 57), PP(12-36) (SEQ ID NO: 58), PP(13-36) (SEQ ID NO: 59), PP(14-36) (SEQ ID NO: 60), PP(15-36) (SEQ ID NO: 61), PP(16-36) (SEQ ID NO: 62), PP(17-36) (SEQ ID NO: 63), PP(18-36) (SEQ ID NO: 64), PP(19-36) (SEQ ID NO: 65), PP(20-36) (SEQ ID NO: 66), PP(21-36) (SEQ ID NO: 67), PP(22-36) (SEQ ID NO: 68), PP(23-36) (SEQ ID NO: 69), PP(24-36) (SEQ ID NO: 70) и PP(25-36) (SEQ ID NO: 71).

Другие PP-агонисты включают в себя овечий PP (SEQ ID NO: 82) и усеченные по аминоконцу формы от PP(3-36) до PP(26-36), как в человеческой форме, свиной PP (SEQ ID NO: 83) и усеченные по аминоконцу формы от PP(3-36) до PP(26-36), как в человеческой форме, собачий PP (SEQ ID NO: 84) и усеченные по аминоконцу формы от PP(3-36) до PP(26-36), как в человеческой форме, кошачий PP (SEQ ID NO: 85) и усеченные по аминоконцу формы от PP(3-36) до PP(26-36), как в человеческой форме, коровий PP (SEQ ID NO: 86) и усеченные по аминоконцу формы от PP(3-36) до PP(26-36), как в человеческой форме, крысиный PP (SEQ ID NO: 87) и усеченные по аминоконцу формы от PP(3-36) до PP(26-36), как в

человеческой форме, мышинный (SEQ 88) и усеченные по аминоконцу формы от PP(3-36) до PP(26-36), как в человеческой форме, и PP морской свинки (SEQ ID NO: 89).

В соответствии с данным изобретением пептид PP также включает в себя свободные основания, соли присоединения кислоты или соли металла, такие как соли калия или натрия, этих пептидов, и пептиды PP, которые модифицированы такими способами, как амидирование, гликозилирование, ацилирование, сульфатирование, фосфорилирование, ацетилирование, циклизация, и другими известными способами ковалентной модификации. Эти пептиды в типичных случаях связываются с Y2-рецепторами в мозге и других местах, особенно с Y2- и/или Y5-рецепторами. В типичных случаях эти пептиды синтезируют в свободных от эндотоксина или пирогена формах, хотя это не всегда является необходимым.

Агенты, способствующие доставке через слизистые оболочки

"Агенты, способствующие доставке через слизистые оболочки", определяют как химические и другие наполнители, которые при добавлении к препарату, содержащему воду, соли и/или обычные буферы и пептиды, связывающиеся с Y2-рецепторами (контрольный препарат), дают препарат, который дает значительное увеличение транспорта пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, через слизистую мембрану при измерении максимальной концентрации (C_{max}) в крови, сыворотке или цереброспинальной жидкости или по площади под кривой, AUC, на графике зависимости концентрации от времени. Слизистая оболочка включает в себя поверхность слизистых носовой полости, ротовой полости, кишки, щеки, бронхов и легких, влагалища и прямой кишки и фактически включает в себя все мембраны, секретирующие слизь, которые выстилают полости или проходы тела и сообщаются с внешней средой. Агенты, способствующие доставке, через слизистые, иногда называют носителями.

Свободный от эндотоксина препарат

Термин "свободный от эндотоксина препарат" означает препарат, который содержит пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, и один или более агентов, способствующих доставке через слизистые оболочки, который, по существу, свободен от эндотоксинов и/или связанных с ними пирогенных веществ. Эндотоксины включают в себя токсины, которые заключены внутри микроорганизма и высвобождаются только когда микроорганизмы разрушены или мертвы. Пирогенные вещества включают в себя индуцирующие лихорадку термостабильные вещества (гликобелки) из наружной мембраны бактерий и других микроорганизмов. Оба этих вещества могут вызывать лихорадку, гипотонию и шок при введении людям. Получение препаратов, свободных от эндотоксина, может требовать специального оборудования и специалистов и может быть значительно более дорогостоящим, чем изготовление препаратов, которые не являются свободными от эндотоксина. Так как было показано, что внутривенное введение NPY или PYY одновременно с инфузией эндотоксина грызунам предотвращает гипотонию и даже смерть, ассоциированные с введением эндотоксина в отдельности (патент США № 4839343), получение препаратов этих терапевтических агентов, свободных от эндотоксина, не считается необходимым для не парентерального (не инъекционного) введения.

Неинфузионное введение

"Неинфузионное введение" означает любой способ доставки, который не включает в себя инъекцию прямо в артерию или вену, способ, при котором принуждается или направляется (в типичных случаях жидкость) во что-то и особенно в часть тела вводится иглу, шприц или другое инвазивное средство. Неинфузионное введение включает в себя подкожную инъекцию, внутримышечную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию и неинъекционные способы доставки на слизистую оболочку.

Лечение и предотвращение ожирения

Как отмечено выше, это изобретение предлагает улучшенные и полезные способы и композиции для доставки, осуществляемой через слизистые оболочки носовой полости, пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, для предотвращения и лечения ожирения у субъектов, представляющих собой млекопитающее. В данном контексте предотвращение и лечение ожирения означают предотвращение начала или снижение частоты и тяжести клинического ожирения путем снижения потребления пищи во время еды и/или снижения массы тела во время введения или поддержания сниженной массы тела после потери массы или до прибавления массы.

Это изобретение предлагает улучшенные и полезные способы и композиции для доставки, осуществляемой через слизистые оболочки носовой полости, пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в области мозга, например гипоталамус или проопиомеланокортиновые (ПОМС) и NPY-нейроны аркуатного ядра, для предотвращения и лечения ожирения у субъектов, представляющих собой млекопитающее. Пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, можно также вводить в сочетании с антагонистом Y1-рецептора, таким как дигидропиридин.

Способы и композиции доставки

Улучшенные способы и композиции для введения, осуществляемого через слизистые оболочки, пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, субъектам, представляющим собой млекопитающее, оптимизируют режимы дозирования пептида, связывающегося с Y2-рецепторами. Данное изобретение предлагает доставку, осуществляемую через слизистые оболочки, пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, введенного в один состав с одним или более агентами, способствующими доставке через слизистые оболочки, причем высвобождение дозы пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, является существенно

нормализованным и/или постоянным для периода эффективной доставки пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в диапазонах от 0,1 до 2,0; от 0,4 до 1,5; от 0,7 до 1,5 или от 0,8 до 1,0 ч после введения через слизистые оболочки. Достигнутому постоянному высвобождению пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, можно способствовать повторным введением экзогенного пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, при использовании способов и композиций по данному изобретению.

Композиции и способы постоянного высвобождения

Улучшенные композиции и способы для введения, осуществляемого через слизистые оболочки, пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, субъектам, представляющим собой млекопитающее, оптимизируют режимы дозировки пептида, связывающегося с Y2-рецепторами. Данное изобретение предлагает улучшенную доставку, осуществляемую через слизистые оболочки (например, носовые), препарата, содержащего пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, в комбинации с одним или более агентами, способствующими доставке через слизистые оболочки, и возможно агентом или агентами, способствующими постоянному высвобождению. Агенты, способствующие доставке через слизистые оболочки, по данному изобретению дают эффективное увеличение доставки, например, увеличение максимальной концентрации в плазме ($C_{\max}$) для способствования терапевтической активности пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, вводимого через слизистые оболочки. Вторым фактором, который влияет на терапевтическую активность пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в плазме крови и в ЦНС, является время удержания (BY). Агенты, способствующие постоянному высвобождению, в комбинации с агентами, способствующими интраназальной доставке, увеличивают $C_{\max}$ и увеличивают время удержания (BY) пептида, связывающегося с Y2-рецепторами. В настоящем изобретении раскрыты полимерные средства доставки и другие агенты и способы по данному изобретению, которые используются в препаратах, способствующих постоянному высвобождению, например полиэтиленгликоль (ПЭГ). Данное изобретение предлагает улучшенный способ доставки и лекарственную форму пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, для лечения симптомов, относящихся к ожирению, раку толстой кишки, панкреатическому раку или раку груди у субъектов, представляющих собой млекопитающее.

В препаратах и способах по этому изобретению для доставки, осуществляемой через слизистые оболочки, пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, часто комбинируют или согласованно вводят с подходящим носителем или с носителем для доставки через слизистые оболочки. В данном контексте термин "носитель" означает фармацевтически приемлемый твердый или жидкий наполнитель, разбавитель или инкапсулирующий материал. Водосодержащий жидкий носитель может содержать фармацевтически приемлемые добавки, такие как подкисляющие агенты, подщелачивающие агенты, противомикробные консерванты, антиоксиданты, забуферивающие агенты, хелатирующие агенты, комплексообразующие агенты, солюбилизирующие агенты, увлажнители, растворители, суспендирующие и/или увеличивающие вязкость агенты, агенты тоничности, смачивающие агенты или другие биосовместимые материалы. Табуляцию ингредиентов, перечисленных по вышеуказанным категориям, можно найти в U.S. Pharmacopeia National Formulary, 1857-1859, (1990). Некоторыми примерами материалов, которые могут служить как фармацевтически приемлемые носители, являются сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошковый трагакант; солод; желатин; тальк; наполнители, такие как шоколадное масло и воски для суппозиториев; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, подсолнечное масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; забуферивающие агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический физраствор; раствор Рингера, растворы этилового спирта и фосфатного буфера, а также другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических препаратах. Смачивающие агенты, эмульгаторы и смазки, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, агенты высвобождения, агенты нанесения оболочки, подслащающие, вкусовые и ароматизирующие агенты, консерванты и антиоксиданты также могут присутствовать в композиции в соответствии с пожеланиями составителя. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают в себя водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеина гидрохлорид, натрия бисульфит, натрия метабисульфит, натрия сульфит и тому подобные; жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (БНА), бутилированный гидрокситолуол (БНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобные; и металл-хелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобные. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалами-носителями для получения стандартной лекарственной формы, должно варьировать в зависимости от конкретного способа введения.

В композициях и способах по этому изобретению для доставки через слизистые оболочки используют различные агенты, способствующие доставке, которые способствуют доставке пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в или через слизистую поверхность. В этом отношении доставка пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, через слизистый эпителий может происходить "трансклеточным" или

"параклеточным" образом. Степень, до которой эти пути вносят вклад в суммарный поток и биологическую доступность пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, зависит от среды слизистой мембраны, физико-химических свойств активного агента и свойств слизистой эпителия. Параклеточный транспорт включает в себя только пассивную диффузию, в то время как трансклеточный транспорт может происходить пассивным, усиленным или активным способами. Обычно, гидрофильные, пассивно транспортируемые полярные растворенные вещества диффундируют параклеточным путем, в то время как более липофильные растворенные вещества используют трансклеточный путь. Абсорбцию и биологическую доступность (например, отраженную коэффициентом проницаемости или физиологическим анализом) для разнообразных пассивно и активно абсорбируемых растворенных веществ можно легко оценить в терминах компонентов как параклеточной, так и трансклеточной доставки для любого выбранного пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, по этому изобретению. Для пассивно абсорбируемых лекарственных средств относительный вклад параклеточного и трансклеточного путей в транспорт лекарственного средства зависит от рКа, коэффициента распределения, молекулярного радиуса и заряда лекарственного средства, pH среды просвета, в который доставляют лекарственное средство, и площади абсорбирующей поверхности. Параклеточный путь представляет собой относительно малую долю доступной поверхности в области эпителия слизистых оболочек носовой полости. В общих словах, сообщалось, что клеточные мембраны занимают область поверхности слизистых, которая является в тысячу раз большей, чем область, занятая параклеточными промежутками. Таким образом, учитывая меньшую доступную область дискриминацию против проникновения макромолекул на основании их размера и заряда, можно предположить, что для транспорта лекарственного средства параклеточный путь обычно должен быть менее предпочтительным путем, чем трансклеточная доставка. Удивительно, что способы и композиции по этому изобретению обеспечивают значительно усиленный транспорт биотерапевтических средств и через слизистые эпителии параклеточным путем. Поэтому способы и композиции по этому изобретению успешно нацелены как на параклеточные, так и на трансклеточные пути, альтернативным образом или в пределах одного способа или композиции.

В данном контексте "агенты, способствующие доставке через слизистые оболочки" включают в себя агенты, которые улучшают высвобождение или растворимость (например, из средства доставки препарата), скорость диффузии, проникающую способность и сроки поглощения, время удержания, стабильность, эффективный период полужизни, уровни пиковой или постоянной концентрации, клиренс и другие желаемые характеристики доставки через слизистые оболочки (например, при измерении в месте доставки или в выбранном целевом месте активности, таком как кровеносная или центральная нервная система) пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, или другого(их) биологически активного(их) соединения(ий). Улучшение доставки через слизистые может, таким образом, происходить через любое множество разных механизмов, например увеличением диффузии, транспорта, сохранности или стабильности пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, увеличением текучести мембраны, модулированием доступности или действия кальция и других ионов, которые регулируют внутриклеточную или параклеточную проникающую способность, солюбилизацией компонентов слизистых оболочек (например, липидов), изменением уровней небелковых и белковых сульфгидрилов в слизистых тканях, увеличением тока воды через слизистые поверхности, модулированием физиологии эпителиальных стыков, снижением вязкости слизи, покрывающей слизистый эпителий, снижением скорости выведения слизи ресничками и другими механизмами.

В данном контексте "количество пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, эффективное через слизистые оболочки" подразумевает эффективную доставку, осуществляемую через слизистые оболочки пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в целевое место для активности лекарственного средства в субъекте, причем эта доставка может вовлекать множество путей доставки или переноса. Например, данный активный агент может пройти через просветы между клетками слизистой оболочки и достичь прилегающей сосудистой стенки, в то время как другим путем этот агент может либо пассивно, либо активно быть захваченным клетками слизистых для действия в пределах этих клеток или для высвобождения или транспортировки из клеток с достижением вторичного целевого места, такого как системное кровообращение. Способы и композиции по этому изобретению могут способствовать транслокации активных агентов по одному или нескольким из таких альтернативных путей или могут действовать прямо на слизистую ткань или проксимальную сосудистую ткань, чтобы способствовать абсорбции или проникновению активного агента(ов). Способствование абсорбции или проникновению в этом контексте не ограничено этими механизмами.

В данном контексте термин "пиковая концентрация ($C_{\max}$) пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в плазме крови", "область под кривой зависимости концентрации в плазме крови от времени (AUC) для пептида, связывающегося с Y2-рецепторами", "время до достижения максимальной концентрации ($t_{\max}$) пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в плазме крови" представляют собой фармакокинетические параметры, известные специалисту. Laursen et al., Eur. J. Endocrinology, 135: 309-315, 1996. "Кривая зависимости концентрации от времени" определяет концентрацию пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в сыворотке крови субъекта в зависимости от времени после введения дозы пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, субъекту через нос, внутримышечным, подкожным или

другим парентеральным путем введения. " $C_{\max}$ " представляет собой максимальную концентрацию пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в сыворотке крови субъекта после введения одной дозы пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, субъекту, " $t_{\max}$ " представляет собой время для достижения максимальной концентрации пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в сыворотке крови субъекта после введения одной дозы пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, субъекту.

В данном контексте термин "площадь под кривой зависимости концентрации в плазме крови от времени (AUC) для пептида, связывающегося с Y2-рецепторами" рассчитывают в соответствии с линейным правилом трапеций и с добавлением остаточных площадей. Уменьшение на 23% или увеличение на 30% между двумя дозами будет выявлено с вероятностью 90% (ошибка типа II, $\beta=10\%$). "Скорость доставки" или "скорость абсорбции" оценивают сравнением времени ($t_{\max}$) достижения максимальной концентрации ($C_{\max}$). Как $C_{\max}$, так и $t_{\max}$ анализируют при использовании непараметрических методов. Сравнение фармакокинетики внутримышечного, подкожного, внутривенного и интраназального введения пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, осуществляют вариационным анализом (ANOVA). При парном сравнении для оценки достоверности используют последовательную процедуру Бонферрони-Холмса. Соотношение доза-ответ у трех интраназальных доз оценивают регрессионным анализом. $P<0,05$ считают достоверным. Результаты представлены как средние значения $\pm$ среднееквадратичная ошибка (SEM).

В то время как механизм способствования абсорбции может варьировать с разными агентами, способствующими доставке через слизистые, по этому изобретению полезные реагенты в этом контексте не должны существенно нежелательным образом влиять на слизистую ткань и должны быть выбраны в соответствии с физико-химическими характеристиками конкретного пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, или другого активного или способствующего доставке агента. В этом контексте агенты, способствующие доставке, которые увеличивают проникновение или увеличивают проницаемость слизистой ткани, часто приводят к некоторому изменению защитного барьера слизистой оболочки. Для того, чтобы такие агенты, способствующие доставке, имели ценность по этому изобретению, обычно желательно, чтобы любые значительные изменения в проницаемости слизистой оболочки являлись обратимыми в пределах временных рамок, подходящих для желаемой длительности доставки лекарственного средства. Более того, не должно быть существенной кумулятивной токсичности и любых перманентных пагубных изменений, индуцированных в барьерных свойствах слизистой оболочки при длительном применении.

В пределах определенных аспектов этого изобретения способствующие абсорбции агенты для согласованного введения или комбинационного препарата с пептидом, связывающимся с Y2-рецепторами, по этому изобретению выбирают из малых гидрофильных молекул, включающих в себя, без ограничения, диметилсульфоксид (ДМСО), диметилформамид, этанол, пропиленгликоль и 2-пирролидоны. Или же для усиления доставки, осуществляемой через слизистые оболочки, пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, можно использовать длинноцепочечные амфипатические молекулы, например децилметилсульфоксид, азон, лаурилсульфат натрия, олеиновую кислоту и соли желчных кислот. В дополнительных аспектах поверхностно-активные агенты (например, полисорбаты) используют как вспомогательные соединения, агенты процессинга или добавки в препарат для способствования интраназальной доставке пептида, связывающегося с Y2-рецепторами. Такие агенты, как ДМСО, полиэтиленгликоль и этанол, могут, если присутствуют в достаточно высоких концентрациях в среде доставки (например, при предварительном введении или включении в терапевтический препарат), поступать в водную фазу слизистой оболочки и изменять ее растворяющие свойства, тем самым способствуя распределению пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, из носителя в слизистую оболочку.

Дополнительные агенты, способствующие доставке через слизистые оболочки, которые являются полезными в согласованном введении и в способах процессинга и в комбинационных препаратах по этому изобретению, включают в себя, без ограничения, смешанные мицеллы; енамины; доноры оксида азота (например, S-нитрозо-N-ацетил-DL-пеницилламин, NOR1, NOR4), которые предпочтительно вводят совместно с перехватчиком NO, таким как карбокси-РТО или доклофенак натрия; салицилат натрия; глицериновые эфиры ацетоуксусной кислоты (например, глицерил-1,3-диацетоацетат или 1,2-изопропилиденглицерин-3-ацетоацетат); и другие агенты, способствующие высвобождению-диффузии или интра- или транс-эпителиальному проникновению, которые являются физиологически совместимыми для доставки через слизистые оболочки. Другие способствующие абсорбции агенты выбирают из множества разных носителей, основ и наполнителей, способствующих доставке через слизистые оболочки, стабильности, активности или транс-эпителиальному проникновению пептида, связывающегося с Y2-рецепторами. Они включают в себя, среди прочего, циклодекстрины и производные β -циклодекстрина (например, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин) и гептакис (2,6-ди-О-метил- β -циклодекстрин). Эти соединения, возможно конъюгированные с одним или более активными ингредиентами и возможно входящие в состав маслянистой основы, способствуют биологической доступности в препаратах для слизистых по этому изобретению. Другие дополнительные способствующие абсорбции агенты, адаптированные для доставки через слизистые, включают в себя среднецепочечные жирные кислоты, включая моно-

и диглицириды (например, каприлат натрия, экстракты коксового масла, Capmul) и триглицериды (например, амилдекстрин, Estaram 299, Miglyol 810).

Доставляемые через слизистые оболочки терапевтические и профилактические композиции по данному изобретению можно обогащать любым подходящим способствующим проникновению агентом, который облегчает абсорбцию, диффузию или проникновение пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, через слизистые барьеры. Промотором проникновения может быть любой фармацевтически приемлемый промотор. Таким образом, в более детальных аспектах этого изобретения предложены композиции, которые включают один или более способствующих проникновению агентов, выбираемых из производных салицилата натрия и салициловой кислоты (ацетилсалицилат, холинсалицилат, салициламид, и т.д.); аминокислот и их солей (например, моноаминокарбоновых кислот, таких как глицин, аланин, фенилаланин, пролин, гидроксипролин и т.д.; гидроксиаминокислот, таких как серин; кислых аминокислот, таких как аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, и т.д.; и основных аминокислот, таких как лизин и т.д., включая их соли со щелочным металлом или щелочно-земельным металлом); и N-ацетиламиноацетат (N-ацетилаланин, N-ацетилфенилаланин, N-ацетилсерин, N-ацетилглицин, N-ацетиллизин, N-ацетилглутаминовая кислота, N-ацетилпролин, N-ацетилгидроксипролин, и т.д.) и их солей (соли щелочного металла и соли щелочно-земельного металла). Также в качестве способствующих проникновению агентов в способах и композициях по этому изобретению предложены вещества, обычно используемые в качестве эмульгаторов (например, натрия олеилфосфат, натрия лаурилфосфат, натрия лаурилсульфат, натрия миристилсульфат, полиоксиэтиленалкильные эфиры и т.д.), капроевая кислота, молочная кислота, яблочная кислота и лимонная кислота и их соли со щелочным металлом, пирролидон-карбоновые кислоты, сложные эфиры алкилпирролидонкарбоновой кислоты, N-алкилпирролидоны, ацильные эфиры пролина и тому подобные.

В различных аспектах этого изобретения предложены препараты и способы улучшенной доставки через слизистые оболочки носовой полости, которые делают возможной доставку пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и других терапевтических агентов по этому изобретению через слизистые барьеры между местами введения и выбранными целевыми местами. Определенные препараты являются специфическим образом адаптированными для выбранной целевой клетки, ткани или органа или даже конкретного заболевания. В других аспектах препараты и способы обеспечивают эффективный, селективный эндо- или транзитоз пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, специфически направленный по определенному внутриклеточному или межклеточному пути. В типичных случаях пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, эффективно вносят при эффективных уровнях концентрации в носитель или другое средство доставки и доставляют и поддерживают в стабилизированной форме, например, у слизистой оболочки носовой полости и/или во время прохода через внутриклеточные компартменты и мембраны к отдаленным целевым местам действия лекарственного средства (например, кровоток или определенная ткань, орган или внеклеточный компартмент). Пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, можно предоставлять в средстве доставки или модифицированным иным образом (например, в пролекарственной форме), причем высвобождение или активация пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, запускается физиологическим стимулом (например, изменением pH, лизосомальными ферментами и т.д.) Часто пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, является фармакологически неактивным, пока не достигает целевого для его активности места. В большинстве случаев, пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, и другие компоненты препарата являются нетоксичными и неиммуногенными. В этом контексте, носители и другие компоненты препарата обычно выбирают по их способности быть быстро разлагаемыми и выводимыми в физиологических условиях. В то же время, эти препараты в лекарственной форме являются химически и физически стабильными для эффективного хранения.

Аналоги и миметики пептидов и белков

Для применения по этому изобретению в пределы определения биологически активных пептидов и белков включены натуральные или синтетические терапевтически или профилактически активные пептиды (состоящие из двух или более ковалентно связанных аминокислот), белки, фрагменты пептида или белка, аналоги пептида или белка и химически модифицированные производные или соли активных пептидов или белков. Для применения по этому изобретению подразумевается широкое множество разных полезных аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, которые можно получать и тестировать на биологическую активность в соответствии с известными способами. Часто пептиды или белки пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, или другие биологически активные пептиды или белки для применения по этому изобретению представляют собой мутеины, которые легко получать частичной заменой, добавлением или делецией аминокислот в пределах встречающейся в природе или нативной (например, соответствующей дикому типу, встречающемуся в природе мутанту или аллельному варианту) пептидной или белковой последовательности. Дополнительно включены биологически активные фрагменты нативных пептидов или белков. Такие мутантные производные и фрагменты по существу сохраняют желаемую биологическую активность нативного пептида или белка. В случае пептидов или белков, имеющих углеводные цепи, биологически активные варианты, характеризующиеся изменениями в этих углеводных группировках, также являются включенными в пределы этого изобретения.

В данном контексте термин "консервативная аминокислотная замена" относится к общей взаимозаменяемости аминокислотных остатков, имеющих похожие боковые цепи. Например, группой обычно взаимозаменяемых аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, являются аланин, валин, лейцин, и изолейцин; группой аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи с гидроксилом, являются серин и треонин; группой аминокислот, имеющих амидсодержащие боковые цепи, являются аспарагин и глутамин; группой аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, являются фенилаланин, тирозин и триптофан; группой аминокислот, имеющих основные боковые цепи, являются лизин, аргинин и гистидин; и группой аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, является цистеин и метионин. Примеры консервативных замен включают в себя замену неполярного (гидрофобного) остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой. Аналогичным образом, данное изобретение подразумевает замену полярного (гидрофильного) остатка, такую как аргинина на лизин, глутамина на аспарагин и треонина на серин. Дополнительно также подразумеваются замена основного остатка, такого как лизин, аргинин или гистидин, на другой или замена кислотного остатка, такого как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, на другой. Примерами групп консервативной аминокислотной замены являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин и аспарагин-глутамин. Выравниванием аналога пептида или белка с оптимально соответствующим нативным пептидом или белком и при использовании надлежащих анализов, например анализов адгезии белка или связывания с рецептором для определения выбранной биологической активности, можно легко идентифицировать работоспособные аналоги пептида и белка для применения в пределах способов и композиций по этому изобретению. Работоспособные аналоги пептида и белка в типичных случаях специфически иммунореактивны с антителами против соответствующего нативного пептида или белка.

Подходом к стабилизации твердых белковых препаратов по этому изобретению является увеличение физической стабильности очищенного, например лиофилизированного, белка. Это должно ингибировать агрегацию из-за гидрофобных взаимодействий, а также по ковалентным путям, которые могут усиливаться при разворачивании белка. Стабилизирующие препараты в этом контексте часто включают в себя препараты на основе полимера, например препарат(система доставки), представляющий(ая) собой биоразлагаемый гидрогель. Как отмечено выше, критическая роль воды в структуре, функции и стабильности белка является хорошо известной. В типичных случаях белки являются относительно стабильными в твердом состоянии при удалении большей части воды. Однако твердые терапевтические белковые препараты могут становиться гидратированными при хранении в условиях повышенной влажности или во время доставки из композиции или устройства для постоянного высвобождения. Стабильность белков обычно падает с увеличением гидратации. Вода может также играть значительную роль в агрегации твердого белка, например, увеличивая гибкость белка, приводящую к усилению доступности активных групп, предоставляя подвижную фазу для взаимодействующих групп и выступая как участник нескольких разрушительных процессов, таких как бета-элиминация и гидролиз.

Белковые препараты, содержащие приблизительно от 6 до 28% воды, являются наиболее нестабильными. Ниже этого уровня подвижность связанной воды и внутренние движения белка являются низкими. Выше этого уровня подвижность воды и движения белка приближаются к таковым при полной гидратации. Вплоть до некоторой точки в нескольких системах наблюдали увеличение подверженности агрегации в твердой фазе при увеличении гидратации. Однако при более высоком содержании воды наблюдают, из-за эффекта разведения, меньшую агрегацию.

В соответствии с этими принципами эффективным способом стабилизации пептидов и белков против агрегации в твердом состоянии для доставки через слизистые оболочки является контроль содержания воды в твердом препарате и поддержание активности воды в препарате на оптимальных уровнях. Этот уровень зависит от природы белка, но, в общем, белки, поддерживаемые ниже их покрытия "монослоем" воды, должны проявлять наибольшую стабильность в твердом состоянии.

По этому изобретению предложено множество разных добавок, разбавителей, основ и средств доставки, которые эффективно контролируют содержание воды для способствования стабильности белка. Эти реагенты и материалы, представляющие собой носители, эффективные в качестве антиагрегационных агентов, в этом смысле включают в себя, например, полимеры различных функциональных группировок, такие как полиэтиленгликоль, декстран, диэтиламиноэтилдекстран и карбоксиметилцеллюлозу, которые значительно увеличивают стабильность и снижают агрегацию в твердой фазе у пептидов и белков, которые смешаны или связаны с ними. В некоторых случаях активности или физической стабильности белков можно способствовать различными добавками к водным растворам пептидного или белкового лекарственного средства. Например, можно использовать такие добавки, как полиолы (в том числе сахара), аминокислоты, белки, такие как коллаген и желатин, и различные соли.

Определенные добавки, в частности сахара и другие полиолы, также придают значительную физическую стабильность сухим, например лиофилизированным, белкам. Эти добавки также можно использовать по этому изобретению для защиты белков от агрегации не только во время лиофилизации, но также во время хранения в сухом состоянии. Например, сахароза и Фиколл 70 (полимер, имеющий сахарозные блоки) проявляет значительную защиту против агрегации пептидов или белков во время инкубации

в твердой фазе в различных условиях. Эти добавки могут также усиливать стабильность твердых белков, внедренных в полимерные матрицы.

Другие дополнительные добавки, например сахара, стабилизируют белки против агрегации в твердом состоянии во влажных атмосферах при повышенных температурах, как может происходить в определенных препаратах для постоянного высвобождения по этому изобретению. Белки, такие как желатин и коллаген, также служат как стабилизирующие или наполняющие агенты для снижения денатурации и агрегации нестабильных белков в этом контексте. Эти добавки можно включать в процесс расплава полимера и в композиции по этому изобретению. Например, полипептидные микрочастицы можно получать простой лиофилизацией или распылительной сушкой раствора, содержащего различные стабилизирующие добавки, описанные выше. Тем самым можно получать постоянное высвобождение неагрегированных пептидов и белков на протяжении длительного периода времени.

Здесь предложены различные дополнительные препаративные компоненты и способы, а также специфичные добавки, которые обеспечивают препараты для доставки, осуществляемой через слизистые оболочки, пептидов и белков, склонных к агрегации, причем пептид или белок является стабилизированным, по существу, в чистой, неагрегированной форме при использовании солюбилизирующего агента. Для применения в этих способах и препаратах подразумевается ряд компонентов и добавок. Примерами этих солюбилизирующих агентов являются связанные димеры циклодекстринов (ЦД), которые селективно связываются с гидрофобными боковыми цепями полипептидов. Было обнаружено, что эти димеры ЦД связываются с гидрофобными участками белков, таким образом, который значительно ингибирует агрегацию. Это ингибирование является селективным по отношению как к димерам ЦД, так и к вовлеченному белку. Такое селективное ингибирование агрегации белка обеспечивает дополнительные преимущества в способах и композициях для интраназальной доставки по этому изобретению. Дополнительные агенты для применения в этом контексте включают в себя тримеры и тетрамеры ЦД с варьирующими геометриями, контролируемые линкерами, которые специфически блокируют агрегацию пептидов и белков. Дополнительные солюбилизирующие агенты и способы для включения в это изобретение включают в себя применение пептидов и пептидомиметиков для селективного блокирования белок-белковых взаимодействий. В одном аспекте специфическое связывание гидрофобных боковых цепей, известное для мультимеров ЦД, расширено на белки применением пептидов и пептидомиметиков, которые аналогичным образом блокируют агрегацию белка. Для включения в композиции и процедуры по этому изобретению доступен широкий диапазон подходящих способов и антиагрегационных агентов.

Агенты и способы модификации заряда и контроля pH

Для улучшения транспортных характеристик биологически активных агентов (в том числе пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, других активных пептидов и белков и лекарственных средств, представляющих собой макромолекулы и малые молекулы) с целью способствовать доставке через гидрофобные барьеры слизистой оболочки, это изобретение также предлагает методики и реагенты для модификации заряда биологически активных агентов или агентов, способствующих доставке, выбранных из описанных здесь. В этой связи относительные проникающие способности макромолекул обычно связаны с их коэффициентами распределения. Степень ионизации молекулы, которая зависит от pK_a молекулы и от pH на поверхности слизистой оболочки, также влияет на проницаемость молекулы. Проникающей способностью и распределению биологически активных агентов, включающих в себя пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, и аналоги по этому изобретению, для доставки через слизистые оболочки можно способствовать изменением заряда или распределением заряда активного агента или агента, способствующего проникновению, что достигается, например, изменением заряда функциональных групп, модифицированием pH средства доставки или раствора, в котором доставляют активный агент, или согласованным введением реагента, изменяющего заряд или pH, с активным агентом.

В соответствии с этими общими указаниями доставку, осуществляемую через слизистые оболочки, заряженных макромолекулярных веществ, в том числе пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и других биологически активных пептидов и белков, в способах и композициях по этому изобретению существенно улучшают при доставке активного агента через слизистую поверхность в существенно неионизированном или нейтральном по электрическому заряду состоянии.

Определенный пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, и другие биологически активные пептидные и белковые компоненты препаратов доставки через слизистые оболочки для применения по этому изобретению следует модифицировать по заряду для получения увеличения плотности положительного заряда пептида или белка. Эти модификации расширены также на катионизацию пептидных и белковых конъюгатов, носителей и других описанных здесь форм доставки. Катионизация дает удобный способ изменения биораспределения и транспортных свойств белков и макромолекул по этому изобретению. Катионизацию осуществляют таким способом, который существенно сохраняет биологическую активность активного агента и ограничивает потенциальные нежелательные побочные эффекты, включающие в себя повреждение ткани и токсичность.

Агенты и способы ингибирования разлагающего фермента

Другим наполнителем, который можно включать в препарат для доставки лекарственного средства через слизистые оболочки, является ингибитор разлагающего фермента. Примеры адгезивных по отно-

шению к слизистым оболочкам комплексов полимера с ингибитором фермента, которые являются полезными в препаратах и способах для доставки через слизистые оболочки по этому изобретению, включают в себя, без ограничения: карбоксиметилцеллюлозу-пепстатин (с антипепсиновой активностью); поли(акриловую кислоту)-ингибитор Боумана-Берка (антихимотрипсин); поли(акриловую кислоту)-химостатин (антихимотрипсин); поли(акриловую кислоту)-эластатин (анти-эластаза); карбоксиметилцеллюлозу-эластатин (антиэластаза); поликарбофил-эластатин (антиэластаза); хитозан-антипаин (анти-трипсин); поли(акриловую кислоту)-бацитрацин (антиаминопептидаза N); хитозан-ЭДТА (антиаминопептидаза N, антикарбоксипептидаза A); хитозан-ЭДТА-антипаин (антитрипсин, антихимотрипсин, антиэластаза). Как описано более подробно ниже, определенные варианты осуществления этого изобретения должны, возможно, включать новое производное хитозана или химически модифицированную форму хитозана. Одно такое новое производное для применения по этому изобретению обозначено как полимер β -[1 $\rightarrow$ 4]-2-гуанидино-2-дезоксид-D-глюкозы (поли-GuD).

В композициях и способах по этому изобретению можно применять любой ингибитор, который ингибирует активность фермента для защиты биологически активного(ых) агента(ов). Полезные ингибиторы фермента для защиты биологически активных белков и пептидов включают в себя, например, соевый ингибитор трипсина, панкреатический ингибитор трипсина, ингибитор химотрипсина и ингибитор трипсина и химотрипсина, выделенный из клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L). Можно использовать комбинации или смеси ингибиторов. Дополнительные ингибиторы протеолитических ферментов для применения по этому изобретению включают в себя овомукоидный фермент, мезилат габаксата, альфа₁-антитрипсин, апротинин, амастатин, бестатин, пуромидин, бацитрацин, лейпепсин, альфа₂-макроглобулин, пепстатин и ингибитор трипсина из яичного белка и соевых бобов. Эти и другие ингибиторы можно использовать в отдельности или в комбинации. Ингибитор(ы) можно включать в носитель или связывать с ним, примером чему является гидрофильный полимер, нанесенный в качестве покрытия на поверхность лекарственной формы, которая должна контактировать со слизистой оболочкой носовой полости, или включенный в наружную фазу поверхности в комбинации с биологически активным агентом или в препарат, который вводят отдельно (например предварительно).

Количество ингибитора, например ингибитора протеолитического фермента, который, возможно, включен в композиции по этому изобретению, должно варьировать в зависимости от (а) свойств конкретного ингибитора, (б) числа функциональных групп, присутствующих в молекуле (с которыми можно провести взаимодействие для введения этиленовой ненасыщенности, необходимой для сополимеризации с мономерами, образующими гидрогель), и (в) числа лектиновых групп, таких как гликозиды, которые присутствуют в молекуле ингибитора. Оно может также зависеть от конкретного терапевтического агента, который предназначен для введения. Вообще говоря, полезное количество ингибитора фермента составляет приблизительно от 0,1 до 50 мг/мл, часто приблизительно от 0,2 до 25 мг/мл и, более обычно, приблизительно от 0,5 до 5 мг/мл препарата (то есть, отдельного препарата ингибитора протеазы или комбинированного препарата с ингибитором и биологически активным агентом).

В случае ингибирования трипсина подходящие ингибиторы можно выбирать из, например, апротинина, BBI, соевого ингибитора трипсина, куриного овомукоида, куриного овоингибитора, человеческого панкреатического ингибитора трипсина, мезилата камостата, флавоноидных ингибиторов, антипаина, лейпептина, р-аминобензамидина, AEBSF, TLCK (тозиллизинхлорметилкетон), APMSF, DFP, PMSF и производных поли(акрилата). В случае ингибирования химотрипсина подходящие ингибиторы можно выбирать, например, из апротинина, BBI, соевого ингибитора трипсина, химостатина, бензилоксикарбонил-Pro-Phe-CHO, FK-448, куриного овоингибитора, комплексов сахара с бифениловыми кислотами, DFP, PMSF, β -фенилпропионата, и производных поли(акрилата). В случае ингибирования эластазы подходящие ингибиторы можно выбирать, например, из эластатина, метоксисуцинил-Ala-Ala-Pro-Val-хлорметилкетона (MPCMK), BBI, соевого ингибитора трипсина, куриного овоингибитора, DFP и PMSF.

Дополнительные ингибиторы фермента для применения по этому изобретению выбирают из широкого диапазона небелковых ингибиторов, которые варьируют по степени их действенности и токсичности. Как описано более подробно ниже, можно легко осуществить иммобилизацию этих вспомогательных агентов на матриксах или других средствах доставки или разработку химически модифицированных аналогов, для снижения или даже элиминации токсичных эффектов в случае наличия таковых. Среди этой широкой группы кандидатных ингибиторов фермента для применения по этому изобретению есть фосфорорганические ингибиторы, такие как диизопропилфторфосфат (DFP) и фенилметилсульфонилфторид (PMSF), которые являются сильнодействующими необратимыми ингибиторами сериновых протеаз (например, трипсина и химотрипсина). Дополнительное ингибирование ацетилхолинэстеразы этими соединениями делает их сильно токсичными в условиях неконтролируемой доставки. Другой кандидатный ингибитор, 4-(2-аминоэтил)-бензолсульфонилфторид (AEBSF), имеет ингибиторную активность, сравнимую с DFP и PMSF, но он является заметно менее токсичным. (4-Аминофенил)-метансульфонилфторида гидрохлорид (APMSF) является другим сильнодействующим ингибитором трипсина, но он токсичен в неконтролируемых условиях. В отличие от этих ингибиторов, 4-(4-

изопропилпиперадинокарбонил)-фенил-1,2,3,4,-тетрагидро-1-нафтоатметансульфонат (FK-448) является низкотоксичным веществом, будучи сильнодействующим и специфичным ингибитором химотрипсина. Дополнительным представителем этой небелковой группы кандидатов в ингибиторы, также проявляющими низкий риск токсичности, является мезилат камостата (N,N'-диметилкарбамоилметил-р-(р'-гуанидинобензоилокси)-фенилацетатметансульфонат).

Еще одним типом ингибирующих фермент агентов для применения в способах и композициях по этому изобретению являются аминокислоты и модифицированные аминокислоты, которые вмешиваются в ферментатическую деградацию конкретного терапевтического соединения. Для применения в этом контексте аминокислоты и модифицированные аминокислоты являются, по существу, нетоксичными, и их можно получать при низкой стоимости. Однако из-за их малого молекулярного размера и хорошей растворимости они легко разбавляются и абсорбируются в слизистых средах. Тем не менее, в надлежащих условиях аминокислоты могут действовать как обратимые конкурентные ингибиторы протеазных ферментов. Определенные модифицированные аминокислоты могут проявлять гораздо более сильную ингибиторную активность. Желаемая модифицированная аминокислота в этом контексте известна как ингибитор "переходного состояния". Сильная ингибиторная активность этих соединений основана на их структурном сходстве с субстратом в его геометрии переходного состояния, причем их обычно выбирают так, что они имеют гораздо более высокое сродство к активному центру фермента по сравнению с самим субстратом. Ингибиторы переходного состояния представляют собой обратимые конкурентные ингибиторы. Примерами этого типа ингибитора являются производные α -аминоборной кислоты, такие как боролейцин, боровалин и бороаланин. Атом бора в этих производных может образовывать тетраэдрический боронатный ион, который считается похожим на переходное состояние пептидов во время их гидролиза аминопептидазами. Эти производные аминокислот представляют собой сильнодействующие и обратимые ингибиторы аминопептидаз, и, по сообщениям, боролейцин является более чем в 100 раз более эффективным в ингибировании фермента, чем бестатин, и более чем в 1000 раз более эффективным, чем пуромицин. Другой модифицированной аминокислотой, относительно которой сообщается о сильной ингибирующей протеазу активности, является N-ацетилцистеин, который ингибирует ферментатическую активность аминопептидазы N. Этот вспомогательный агент также проявляет муколитические свойства, которые можно использовать в способах и композициях по этому изобретению для снижения эффектов диффузионного барьера в слизи.

Еще одни полезные ингибиторы фермента для применения в способах согласованного введения и в комбинационных препаратах по этому изобретению можно выбирать из ингибиторов фермента, представляющих собой пептиды и модифицированные пептиды. Важным представителем этого класса ингибиторов является циклический додекапептид, бацитрацин, полученный из *Bacillus licheniformis*. В дополнение к этим типам пептидов определенные дипептиды и трипептиды проявляют слабую, неспецифичную ингибиторную активность по отношению к некоторым протеазам. По аналогии с аминокислотами, их ингибиторную активность можно улучшить химическими модификациями. Например, фосфинокислотные аналоги дипептида также представляют собой ингибиторы "переходного состояния" с сильной ингибиторной активностью по отношению к аминопептидазам. По сообщениям, их используют для стабилизации вводимого через нос лейцин-энкефалина. Другим примером аналога переходного состояния является модифицированный пентапептид пепстатин, который является очень сильнодействующим ингибитором пепсина. Структурный анализ пепстатина тестированием ингибиторной активности нескольких синтетических аналогов продемонстрировал основные структурно-функциональные характеристики молекулы, ответственные за эту ингибиторную активность. Другой особый тип модифицированного пептида включает в себя ингибиторы с концевой альдегидной функциональной группировкой в их структуре. Например, обнаружено, что последовательность бензилоксикарбонил-Pro-Phe-CHO, которая отвечает известным первичным и вторичным специфическим требованиям к химотрипсину, является сильнодействующим обратимым ингибитором этой целевой белказы. В данной области также известны химические структуры дополнительных ингибиторов с локализованной на конце альдегидной функциональной группировкой, например антипаина, лейпептина, хмостатина и эластатина, а также структуры других известных обратимых ингибиторов, представляющих собой модифицированный пептид, таких как фосфорамидон, бестатин, пуромицин и амастатин.

Из-за сравнительно высокой молекулярной массы полипептидные ингибиторы протеазы больше подходят для концентрированной доставки в матрикс носителя лекарственного средства, чем соединения меньших размеров. Дополнительные агенты для ингибирования протеазы в препаратах и способах по этому изобретению включают в себя применение комплексообразующих агентов. Эти агенты опосредуют ингибирование фермента, лишая среду носовой полости (или препаративной или терапевтической композиции) двухвалентных катионов, которые являются кофакторами многих протеаз. К примеру, комплексообразующие агенты ЭДТА и DTPA при согласованном введении или в качестве вспомогательных агентов, введенных в состав комбинационного препарата, в подходящей концентрации должны быть достаточными для ингибирования избранных протеаз, что тем самым способствует интраназальной доставке биологически активных агентов по этому изобретению. Дополнительными представителями этого класса ингибиторных агентов являются ЭГТА, 1,10-фенантралин и гидроксихинолин. Кроме того, из-за

их склонности хелатировать двухвалентные катионы эти и другие комплексообразующие агенты являются полезными в этом изобретении как прямо способствующие абсорбции агенты.

Как отмечено более детально здесь и в других местах, также подразумевается использование различных полимеров, особенно полимеров, адгезивных по отношению к слизистым оболочкам, в качестве агентов ингибирования фермента в способах и композициях по этому изобретению, представляющих собой согласованное введение, мультипроцессинг и/или комбинационный препарат. Например, производные поли(акрилат)а, такие как поли(акриловая кислота) и поликарбофил, могут влиять на активность различных протеаз, в том числе трипсина, химотрипсина. Ингибиторный эффект этих полимеров может также быть основанным на комплексации двухвалентных катионов, таких как Ca^{2+} и Zn^{2+} . Дополнительно подразумевается, что эти полимеры могут служить как партнеры конъюгации или носители для дополнительных агентов, ингибирующих фермент, которые описаны выше. Например, был разработан конъюгат хитозан-ЭДТА, который является полезным в этом изобретении и проявляет сильные ингибиторные эффекты по отношению к энзиматической активности цинкзависимых протеаз. Не ожидается, что свойства адгезивности к слизистым оболочкам у полимеров после ковалентного присоединения других ингибиторов фермента будут в этом контексте существенно ослаблены, как не ожидается и то, что будет уменьшена общая применимость таких полимеров в качестве средства доставки биологически активных агентов по этому изобретению. Напротив, уменьшенное расстояние между средством доставки и слизистой поверхностью, которое создает механизм адгезивности к слизистым, должно минимизировать досистемный метаболизм активного агента, в то время как ковалентно связанные ингибиторы фермента остаются концентрированными в месте доставки лекарственного средства, минимизируя нежелательные эффекты разведения ингибиторов, а также вызываемые ими токсичные и другие побочные эффекты. Таким образом, эффективное количество согласованно введенного ингибитора фермента можно снизить, благодаря исключению эффектов разведения.

Примеры комплексов полимера и ингибитора фермента, которые являются адгезивными к слизистым и полезными в препаратах для доставки через слизистые и в способах по этому изобретению, включают в себя без ограничения: карбоксиметилцеллюлозу-пепстатин (с антипепсиновой активностью); поли(акриловую кислоту)-ингибитор Боумана-Бёрка (антихимотрипсин); поли(акриловую кислоту)-химостатин (антихимотрипсин); поли(акриловую кислоту)-эластатин (антиэластаза); карбоксиметилцеллюлозу-эластатин (антиэластаза); поликарбофил-эластатин (антиэластаза); хитозан-антипаин (антитрипсин); поли(акриловую кислоту)-бацитрацин (антиаминопептидаза N); хитозан-ЭДТА (антиаминопептидаза N, антикарбоксипептидаза A); хитозан-ЭДТА-антипаин (антитрипсин, антихимотрипсин, антиэластаза).

Муколитические и удаляющие слизь агенты и способы

Эффективная доставка биотерапевтических агентов интраназальным введением должна учитывать снижение скорости транспорта лекарственного средства через защитную слизевую выстилку слизистой оболочки носовой полости вдобавок к потере лекарственного средства из-за связывания с гликобелками слоя слизи. Нормальная слизь является вязко-эластичной гелеподобной субстанцией, состоящей из воды, электролитов, муцинов, макромолекул и затопленных в ней эпителиальных клеток. Она служит главным образом в качестве цитозащитного и смазывающего покрытия для находящихся под ней слизистых тканей. Слизь секретируют случайным образом распределенные секреторные клетки, находящиеся в эпителии носовой полости и в других слизистых эпителиях. Структурной единицей слизи является муцин. Этот гликопротеин является, главным образом, ответственным за вязко-эластичную природу слизи, хотя другие макромолекулы также могут вносить вклад в это свойство. В слизи дыхательных путей такие макромолекулы включают в себя продуцируемые на месте секреторные IgA, IgM, IgE, лизоцим и бронхотрансферрин, которые также играют важную роль в защитных механизмах хозяина.

Способы согласованного введения по этому изобретению, возможно, включают эффективные муколитические или удаляющие слизь агенты, которые служат для разложения, истончения или удаления слизи из слизистых поверхностей носовой полости с целью облегчения абсорбции биотерапевтических агентов, вводимых через нос. В этих способах муколитический или удаляющий слизь агент согласованно вводят в качестве вспомогательного соединения для способствования интраназальной доставке биологически активного агента. Или же эффективное количество муколитического или удаляющего слизь агента включают в качестве агента процессинга в способе мультипроцессинга по этому изобретению или в качестве добавки в комбинационном препарате по этому изобретению для получения улучшенного препарата, который способствует интраназальной доставке биотерапевтического соединения, снижая барьерные эффекты слизи носовой полости.

Для включения в способы и композиции по этому изобретению доступно множество разных муколитических или удаляющих слизь агентов. На основании механизмов их действия муколитические и удаляющие слизь агенты часто можно классифицировать по нижеследующим группам: протеазы (например, проназа, папаин), которые расщепляют белковую сердцевину муциновых гликобелков; сульфгидрильные соединения, которые расщепляют дисульфидные связи мукобелка; и детергенты (например, Triton X-100, Tween 20), которые разрушают нековалентные связи в слизи. Дополнительные соединения в этом контексте включают в себя, без ограничения, соли желчных кислот и поверхностно-активные

агенты, например, дезоксихолат натрия, тауродезоксихолат натрия, гликохолат натрия и лизофосфатидилхолин.

Эффективность солей желчных кислот в структурном разрушении слизи имеет такой порядок: дезоксихолат > таурохолат > гликохолат. Другие эффективные агенты, которые снижают вязкость или адгезию слизи для способствования интраназальной доставке в соответствии со способами по этому изобретению, включают в себя, например, короткоцепочечные жирные кислоты и муколитические агенты, которые действуют хелатированием, такие как N-ацилколлагеновые пептиды, желчные кислоты и сапонины (последние действуют частично хелатированием Ca^{2+} и/или Mg^{2+} , которые играют важную роль в поддержании структуры слоя слизи).

Дополнительные муколитические агенты для применения в способах и композициях по этому изобретению включают в себя N-ацетил-L-цистеин (ACS), сильнодействующий муколитический агент, который снижает как вязкость, так и клейкость бронхо-легочной слизи и, по сообщениям, умеренно увеличивает биологическую доступность через нос для человеческого гормона роста у анестезированных крыс (от 7,5 до 12,2%). Эти и другие муколитические или удаляющие слизь агенты приводят в контакт со слизистой мембраной носа, в типичных случаях в диапазоне концентраций приблизительно от 0,2 до 20 мМ, согласованно с введением биологически активного агента для снижения полярной вязкости и/или эластичности слизи в носу.

Кроме того, другие муколитические или удаляющие слизь агенты можно выбирать из ряда ферментов гликозидаз, которые способны расщеплять гликозидные связи в гликопротеине слизи. Репрезентативными для этого класса ферментов являются α -амилаза и β -амилаза, хотя их муколитические эффекты могут быть ограниченными. Напротив, бактериальные гликозидазы позволяют этим микроорганизмам проникать через слой слизи их хозяев.

Неионные детергенты обычно также являются полезными в качестве муколитических или удаляющих слизь агентов для комбинационного применения с большинством биологически активных агентов по этому изобретению, в том числе пептидными и белковыми терапевтическими средствами. Эти агенты в типичных случаях не должны модифицировать или существенно нарушать активность терапевтических полипептидов.

Цилиостатические агенты и способы

Из-за того, что самоочищающая способность определенных слизистых тканей (например, носовых слизистых тканей) мукоцилиарным очищением является необходимой в качестве защитной функции (например, для удаления пыли, аллергенов и бактерий), обычно считают, что эту функцию не следует существенно нарушать лечением через слизистые. Мукоцилиарный транспорт в респираторном тракте является особенно важным защитным механизмом против инфекций. Для достижения этой функции биение ресничек в носовых и дыхательных проходах движет слой слизи вдоль слизистой оболочки для удаления частиц и микроорганизмов, попавших туда при вдохе.

Цилиостатические агенты находят применение в способах и композициях по этому изобретению для увеличения времени удержания вводимых через слизистые (например, через нос) пептидов, связывающихся с Y2-рецепторами, аналогов и миметиков и других биологически активных агентов, которые здесь раскрыты. В частности, доставке этих агентов в способах и композициях по этому изобретению значительно способствует в определенных аспектах согласованное введение или комбинационный препарат одного или нескольких из цилиостатических агентов, которые действуют для обратимого ингибирования активности ресничек клеток слизистой оболочки с целью обеспечивать временное обратимое увеличение времени удержания активного(ых) агент(ов), вводимого(ых) через слизистые. Для применения по этим аспектам этого изобретения вышеуказанные цилиостатические факторы, либо специфичные, либо непрямые по их активности, все являются кандидатами для успешного использования в качестве цилиостатических агентов в надлежащих количествах (в зависимости от концентрации, длительности и способа доставки), таких, что они обеспечивают временное (то есть, обратимое) снижение или прекращение удаления слизи ресничками на слизистой в месте введения для способствования доставке пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, аналогов и миметиков и других биологически активных агентов, которые здесь раскрыты, без неприемлемых нежелательных побочных эффектов.

В более детальных аспектах используют конкретный цилиостатический фактор в комбинированном препарате или протоколе согласованного введения с одним или более чем одним из пептидов, связывающихся с Y2-рецепторами, белков, аналогов и миметиков и/или других биологически активных агентов, которые здесь раскрыты. В этих вариантах осуществления этого изобретения можно использовать различные бактериальные цилиостатические факторы, выделенные и охарактеризованные в литературе. Цилиостатические факторы из бактерии *Pseudomonas aeruginosa* включают в себя производное феназина, пиосоединение (2-алкил-4-гидроксихинолины) и рамнолипид (также известный как гемолизин). Пиосоединение вызывает цилиостаз при концентрации 50 мкг/мл и без очевидных ультраструктурных поражений. Производное феназина также ингибирует подвижность ресничек, но вызывает некоторое разрушение мембран, хотя при существенно более высоких концентрациях 400 мкг/мл. Ограниченное взаимодействие эксплантов трахеи с рамнолипидом приводит к цилиостазу, который ассоциирован с изменени-

ем реснитчатых мембран. Более длительное взаимодействие с рамнолипидом ассоциировано с удалением ветвей динеина из аксоном.

Поверхностно-активные агенты и способы

В более детальных аспектах этого изобретения можно использовать один или более агентов, способствующих проникновению через мембраны, в способе доставки через слизистые или препарате по этому изобретению для способствования доставке, осуществляемой через слизистые оболочки, пептидов, связывающихся с Y2-рецепторами, белков, аналогов и миметиков и других биологически активных агентов, которые здесь раскрыты. Агенты, способствующие проникновению через мембраны, в этом контексте можно выбирать из: (i) поверхностно-активного агента, (ii) соли желчной кислоты, (iii) фосфолипидной добавки, смешанной мицеллы, липосомы или носителя, (iv) спирта, (v) енамина, (vi) соединения, являющегося донором NO, (vii) длинноцепочечной амфипатической молекулы, (viii) малого гидрофобного агента, способствующего проникновению, (ix) производного натрия или салициловой кислоты; (x) глицеринового эфира ацетоксусной кислоты; (xi) производного циклодекстрина или бета-циклодекстрина, (xii) жирной кислоты с цепью средней длины, (xiii) хелатирующего агента, (xiv) аминокислоты или ее соли, (xv) N-ацетиламиноамина или ее соли, (xvi) фермента, разлагающего выбранный компонент мембраны, (xvii) ингибитора синтеза жирных кислот или (xviii) ингибитора синтеза холестерина, или (xix) любой комбинации агентов, способствующих проникновению через мембраны, которые указаны в (i)-(xix).

Определенные поверхностно-активные агенты легко включать в препараты для доставки через слизистые оболочки и в способы по этому изобретению в качестве агентов, способствующих абсорбции через слизистые оболочки. Эти агенты, которые можно согласованно вводить или можно комбинированно включать в один препарат с пептидами, связывающимися с Y2-рецепторами, белками, аналогами и миметиками и другими биологически активными агентами, которые здесь раскрыты, можно выбирать из обширной совокупности известных поверхностно-активных агентов. Поверхностно-активные агенты обычно делятся на три класса: (1) неионные эфиры полиоксиэтилена; (2) соли желчных кислот, такие как натрия гликохолат (SGC) и дезоксикхолат (DOC); и (3) производные фузидовой кислоты, такие как натрия тауродицидифуридат (STDHF). Механизмы действия этих различных классов поверхностно-активных агентов в типичных случаях включают в себя сольubilизацию биологически активного агента. Для белков и пептидов, которые часто формируют агрегаты, поверхностно-активные свойства этих промоторов абсорбции могут сделать возможными такие взаимодействия с белками, что более мелкие единицы, такие как покрытые поверхностно-активным агентом мономеры, могут более легко поддерживаться в растворе. Примерами других поверхностно-активных агентов являются L- α -фосфатидилхолиндидаканойл (DDPC), полисорбат 80 и полисорбат 20. Эти мономеры предпочтительно являются более транспортными единицами, чем агрегаты. Вторым потенциальным механизмом является защита пептида или белка от протеолитической деградации протеазами в среде слизистых оболочек. Как соли желчных кислот, так и некоторые производные фузидовой кислоты, по сообщениям, ингибируют протеолитическую деградацию белков гомогенатами носа при концентрациях, меньших, чем те, или эквивалентных тем, которые требуются для способствования абсорбции белка. Это ингибирование протеазы может быть особенно важным для пептидов с короткими биологическими периодами полужизни.

Ферменты разложения и ингибиторы синтеза жирных кислот и холестерина

В связанных аспектах этого изобретения пептиды, связывающиеся с Y2-рецепторами, белки, аналоги и миметики и другие биологически активные агенты для введения через слизистые вводят в один состав или согласованно вводят с агентом, способствующим проникновению, выбираемым из фермента деградации, или агентом, стимулирующим метаболизм, или ингибитором синтеза жирных кислот, стеролов или другие выбранных компонентов эпителиального барьера (патент США № 6190894). Например, разлагающие ферменты, такие как фосфолипаза, гиалуронидаза, нейраминидаза и хондритиназа, можно использовать для способствования проникновению через слизистые пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, белков, аналогов и миметиков и других биологически активных агентов без причинения необратимого повреждения слизистому барьеру. В одном варианте осуществления хондритиназу используют в способе или композиции, предложенных здесь, для изменения гликобелковых или гликолипидных составных частей барьера проникновению через слизистую мембрану, тем самым, способствуя абсорбции, осуществляемой через слизистые оболочки, пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, белков, аналогов и миметиков и других биологически активных агентов, которые здесь раскрыты.

Что касается ингибиторов синтеза составных частей слизистого барьера, отмечено, что свободные жирные кислоты составляют 20-25% эпителиальных липидов по массе. Двумя ограничивающими скоростью ферментами в биосинтезе свободных жирных кислот являются ацетилКоА-карбоксилаза и синтетаза жирных кислот. Через ряд стадий свободные жирные кислоты метаболизируются в фосфолипиды. Таким образом, ингибиторы синтеза и метаболизма свободных жирных кислот для применения в способах и композициях по этому изобретению включают в себя, без ограничения, ингибиторы ацетилКоА-карбоксилазы, такие как 5-тетрадецилокси-2-фуранкарбоновая кислота (TOFA); ингибиторы синтетазы жирных кислот; ингибиторы фосфолипазы A, такие как гомизин A, 2-(п-амилциннамил)-амино-4-хлорбензойная кислота, бромфенацилбромид, моноалдид, 7,7-диметил-5,8-эйкозациеновая кислота, ни-

церголин, цефалантин, никардипин, кверцетин, дибутирилциклоАМФ, R-24571, N-олеоилэтанолламин, N-(7-нитро-2,1,3-бензоксадиазол-4-ил)-фосфатидилсерин, циклоспорин А, местные анестетики, в том числе дибукаин, фениламин, ретиноиды, такие как полностью транс- и 13-цис-ретиноевая кислота, W-7, трифторперазин, R-24571 (калмидазолий, 1-гексадоцил-3-трифторэтилглицеро-sn-2-фосфоментол (MJ33); блокаторы каналов для кальция, в том числе никардипин, верапамил, дилтиазем, нифедипин и нимодипин; антималярийные средства, в том числе хинакрин, мепакрин, хлорохин и гидроксихлорохин; бета-блокаторы, в том числе пропранолол и лабеталол; антагонисты кальмодулина; EGTA; тимерсол; глюкокортикостероиды, в том числе дексаметазон и преднизолон, и нестероидные противовоспалительные агенты, в том числе индометацин и напроксен.

Свободные стеролы, главным образом холестерин, составляют 20-25% эпителиальных липидов по массе. Ограничивающим скорость ферментом в биосинтезе холестерина является 3-гидрокси-3-метилглутарил (ГМГ)КоА-редуктаза. Ингибиторы синтеза холестерина для применения в способах и композициях по этому изобретению включают в себя, без ограничения, конкурентные ингибиторы ГМГКоА-редуктазы, такие как симвастатин, ловастатин, флуиндостатин (флувастатин), правастатин, мевастатин, а также другие ингибиторы ГМГКоА-редуктазы, такие как олеат холестерина, сульфат и фосфат холестерина и оксигенированные стеролы, такие как 25-ОН- и 26-ОН-холестерин; ингибиторы синтетазы сквалена; ингибиторы эпоксидазы сквалена; ингибиторы дельта7- или дельта24-редуктаз, такие как 22,25-диазахолестерин, 20,25-диазахолестанол, АУ9944 и трипаранол.

Каждый из ингибиторов синтеза жирных кислот или ингибиторов синтеза стеролов можно согласованно вводить или можно комбинировать в составе с одним или несколькими из белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и других биологически активных агентов, описанных здесь, для достижения усиленного эпителиального проникновения активного(ых) агента(ов). Диапазон эффективных концентраций ингибитора стеролов в терапевтическом или вспомогательном препарате для доставки через слизистые оболочки составляет обычно приблизительно от 0,0001 до 20 мас.% от суммарной массы, в более типичных случаях приблизительно от 0,01 до 5%.

Способы и агенты, являющиеся донорами оксида азота

В других связанных аспектах этого изобретения донор оксида азота (NO) выбирают в качестве агента, способствующего проникновению через мембраны, для способствования доставке через слизистые одного или нескольких из белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и других биологически активных агентов, описанных здесь. В данной области известны различные доноры NO, применимые при эффективных концентрациях в способах и препаратах по этому изобретению. Примеры доноров NO включают в себя, без ограничения, нитроглицерин, нитропруссид, NOC5 [3-(2-гидрокси-1-(метилэтил)-2-нитрозогидразино)-1-пропанамин], NOC12 [N-этил-2-(1-этилгидрокси-2-нитрозогидразино)этанамин], SNAP [S-нитрозо-N-ацетил-DL-пеницилламин], NORI и NOR4. В способах и композициях по этому изобретению эффективное количество выбранного донора NO согласованно вводят в или через слизистый эпителий или комбинируют вместе с одним или несколькими из белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и/или других биологически активных агентов, описанных здесь.

Агенты для модулирования структуры и/или физиологии эпителиальных стыков

Данное изобретение предлагает фармацевтическую композицию, которая содержит один или несколько из белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и(или) других биологически активных агентов в комбинации с агентами, способствующими доставке через слизистые, описанными здесь, введенными в состав фармацевтического препарата для доставки через слизистые оболочки.

Агент проницаемости обратимо способствует параклеточному транспорту через слизистый эпителий, в типичных случаях модулированием структуры и/или физиологии эпителиальных стыков на поверхности слизистого эпителия в субъекте. Этот эффект в типичных случаях вовлекает ингибирование агентом проницаемости гомотипических или гетеротипических связей между адгезивными белками соседствующих эпителиальных клеток эпителиальной мембраны. Целевые белки этого блокирования гомотипического или гетеротипического связывания можно выбирать из различных родственных стыковых молекул адгезии (СМА), окклюдинов или клаудинов.

В других дополнительных подробных вариантах осуществления это изобретение предлагает увеличивающие проницаемость пептиды и аналоги и миметики пептидов для способствования параклеточному транспорту через слизистый эпителий. Эти пептиды и аналоги и миметики пептида в типичных случаях действуют в композициях и способах по этому изобретению модулированием структуры и/или физиологии эпителиальных стыков в субъекте, представляющем собой млекопитающее. В определенных вариантах осуществления эти пептиды и аналоги и миметики пептида эффективно ингибируют гомотипическое и/или гетеротипическое связывание адгезивных белков эпителиальной мембраны, выбранных из стыковой молекулы адгезии (СМА), окклюдина или клаудина.

Одним таким агентом, который был подробно исследован, является бактериальный токсин из *Vibrio cholerae*, известный как "токсин запирающей зоны" (ZOT). Этот токсин опосредствует увеличение проницаемости слизистой кишечника и вызывает симптомы заболевания, включающие в себя диарею, у ин-

фицированных субъектов: Fasano et al, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 8:5242-5246 (1991). При тестировании на слизистой оболочке тонкой кишки кролика ZOT увеличивал кишечную проницаемость модулированием структуры межклеточных плотных стыков. Более недавно было найдено, что ZOT способен обратимо открывать плотные стыки в кишечной слизистой оболочке. Также сообщалось, что ZOT способен обратимо открывать плотные стыки в слизистой оболочке носовой полости. Патент США № 5908825.

В способах и композициях по этому изобретению ZOT, а также различные аналоги и миметики ZOT, которые действуют как агонисты или антагонисты активности ZOT, являются полезными для способствования интраназальной доставке биологически активных агентов увеличением параклеточной абсорбции в (через) слизистую оболочку носа. В этом контексте ZOT в типичных случаях действует, вызывая структурную реорганизацию плотных стыков, характеризующуюся изменением локализации стыкового белка ZO1. В этих аспектах настоящего изобретения ZOT согласованно вводят или комбинируют в одном препарате с биологически активным агентом в эффективном количестве для получения значительно усиленной абсорбции активного агента обратимым увеличением проницаемости слизистых оболочек носовой полости без существенных нежелательных побочных эффектов.

Вазодилататорные агенты и способы

Еще одним классом способствующих абсорбции агентов, показывающих выгодную применимость в способах и композициях по этому изобретению, которые представляют собой согласованное введение и комбинационный препарат, являются вазоактивные соединения, более конкретно, вазодилататоры. Эти соединения действуют в настоящем изобретении модулированием структуры и физиологии сосудистой системы под слизистыми, увеличивая скорость транспорта пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, его аналогов и миметиков и других биологически активных агентов в или через слизистый эпителий и/или в конкретные целевые ткани или компартменты (например, системное кровообращение или центральная нервная система).

Вазодилататорные агенты для применения в этом изобретении в типичных случаях вызывают расслабление кровеносных сосудов под слизистой оболочкой либо уменьшением цитоплазматического кальция, либо увеличением оксида азота (NO), либо ингибированием киназы легких цепей миозина. Их обычно подразделяют на 9 классов: антагонисты кальция, открыватели каналов для калия, ингибиторы ангиотензинконвертирующего фермента, антагонисты рецепторов ангиотензина-II, антагонисты α -адренергических рецепторов и рецепторов имидазола, β 1-адренергические агонисты, ингибиторы фосфодиэстеразы, эйкозаноиды и доноры NO.

Несмотря на химические различия, фармакокинетические свойства антагонистов кальция являются одинаковыми. Абсорбция в системное кровообращение является высокой, и поэтому эти агенты претерпевают значительный метаболизм первого прохождения в печени, приводящий к индивидуальным вариациям в фармакокинетике. Кроме более новых лекарственных средств дигидропиридинового типа (амлодипин, фелодипин, исрадипин, нилвадипин, низолдипин и нитрендипин) антагонисты кальция имеют короткий период полужизни. Поэтому для поддержания эффективной концентрации лекарственного средства для многих из них может требоваться доставка множественной дозировкой или препаратами контролируемого высвобождения, как описано здесь и в других местах. Лечение открывателем каналов для калия миноксидилом также может быть ограничено в способе и уровне введения из-за потенциальных нежелательных побочных эффектов.

Ингибиторы ангиотензин-конвертирующего фермента предотвращают превращение ангиотензина-I в ангиотензин-II и являются наиболее эффективными, когда увеличена продукция ренина. Поскольку ангиотензин-конвертирующий фермент является идентичным кининазе-II, которая инактивирует сильнодействующий эндогенный вазодилататор брадикинин, ингибирование ангиотензин-конвертирующего фермента вызывает снижение деградации брадикинина. Ингибиторы ангиотензин-конвертирующего фермента обеспечивают дополнительную выгоду, состоящую в защищающих и репарирующих сердце эффектах, предотвращением и обращением вспять фиброза сердца и гипертрофии желудочков в моделях на животных. Преобладающим путем выведения большинства ингибиторов ангиотензин-конвертирующего фермента является экскреция почками. Поэтому почечные нарушения ассоциированы со сниженной его элиминацией, и для пациентов с умеренными почечными нарушениями рекомендуется снижение дозировки на 25-50%.

Что касается доноров NO, эти соединения являются особенно полезными в этом изобретении из-за их дополнительного влияния на проницаемость слизистых оболочек. Вдобавок к вышеуказанным донорам NO, комплексы NO с нуклеофилами, называемые NO/нуклеофилы или NONO-аты, спонтанным и неферментатическим образом высвобождают NO при растворении в водном растворе при физиологическом pH. Напротив, нитровазодилататоры, такие как нитроглицерин, требуют специфической энзиматической активности для высвобождения NO. NONO-аты высвобождают NO с определенной стехиометрией и при предсказуемых скоростях в диапазоне от <3 мин для диэтиламина/NO до приблизительно 20 ч для диэтилентриамин/NO (DETANO).

В определенных способах и композициях по этому изобретению выбранный вазодилататорный агент согласованно вводят (например, системно или через нос, одновременно или в комбинации)

эффективной временной ассоциации) или в комбинированном составе с одним или более из пептидов, связывающихся с Y2-рецепторами, аналогов и миметиков и других(ого) биологически активных(ого) агентов(а) в количестве, которое является эффективным в способствовании абсорбции, осуществляемой через слизистые оболочки, активных(ого) агентов(а) для достижения целевой ткани или компартмента в субъекте (например, печени, портальной вены печени, ткани или жидкости ЦНС или плазмы крови).

Агенты и способы, способствующие селективному транспорту

Композиции и способы доставки по этому изобретению, возможно, включают агент, способствующий селективному транспорту, который облегчает транспорт одного или нескольких из биологически активных агентов. Эти способствующие транспорту агенты можно использовать в комбинационном препарате или протоколе согласованного введения с одним или несколькими из белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, описанных здесь, для согласованного способствования доставке одного или нескольких из дополнительных биологически активных агентов через барьеры транспорта через слизистые с целью способствования доставке через слизистые активного(ых) агента(ов) для достижения целевой ткани или компартмента в субъекте (например, слизистого эпителия, печени, ткани или жидкости ЦНС или плазмы крови). Или же, способствующие транспорту агенты можно использовать в комбинационном препарате или протоколе согласованного введения для прямого способствования доставке, осуществляемой через слизистые, одного или нескольких из белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в сочетании или без сочетания с усиленной доставкой дополнительного биологически активного агента.

Примеры агентов, способствующих селективному транспорту, для применения по этому аспекту настоящего изобретения включают в себя, без ограничения, гликозиды, сахарсодержащие молекулы и связывающиеся с сахаром агенты, такие как лектиновые связывающиеся агенты, которые известны специфическим взаимодействием с компонентами барьера для эпителиального транспорта. Например, в качестве носителей или конъюгированных медиаторов транспорта для способствования доставке через слизистые оболочки, например через слизистые оболочки носовой полости, биологически активных агентов по этому изобретению можно использовать конкретные "биоадгезивные" лиганды, в том числе, различные растительные и бактериальные лектины, которые связываются с группировками сахаров поверхности клетки опосредованными рецепторами взаимодействиями. Определенные биоадгезивные лиганды для применения по этому изобретению опосредуют передачу биологических сигналов эпителиальным целевым клеткам, которые запускают селективное поглощение адгезивного лиганда посредством специализированных процессов клеточного транспорта (эндоцитоз или транцитоз). Поэтому эти медиаторы транспорта можно использовать в качестве "системы носителей" для стимуляции или прямого селективного поглощения одного или нескольких из белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и других биологически активных агентов в и(или) через слизистые эпителии. Эти и другие агенты, способствующие селективному транспорту, значительно способствуют доставке, осуществляемой через слизистые оболочки, макромолекулярных биофармацевтических средств (особенно пептидов, белков, олигонуклеотидных и полинуклеотидных векторов) по этому изобретению. Лектины представляют собой растительные белки, которые связываются со специфическими сахарами, находящимися на поверхности гликобелков и гликолипидов эукариотических клеток. Концентрированные растворы лектинов имеют "мукоаттрактивный" эффект, и различные исследования продемонстрировали быстрый опосредованный рецепторами эндоцитоз (RME) лектинов и лектиновых конъюгатов (например, конканавалин А, конъюгированный с коллоидными частицами золота) через слизистые поверхности. Дополнительные исследования сообщили, что механизмы поглощения лектинов можно использовать для нацеливания кишечных лекарственных средств *in vivo*. В некоторых из этих исследований полистироловые наночастицы (500 нм) были ковалентно связаны с лектином томата, и сообщается о достижении улучшенного системного поглощения после перорального введения крысам.

В дополнение к растительным лектинам микробные факторы адгезии и инвазии дают богатый источник кандидатов для применения в качестве адгезивных/селективных транспортных носителей в способах и композициях для доставки через слизистые оболочки по этому изобретению. Два компонента являются необходимыми для процессов бактериального прикрепления, бактериальный "адгезин" (фактор прикрепления или колонизации) и рецептор на поверхности хозяйской клетки. Бактериям, вызывающим инфекции слизистых, нужно проникнуть через слой слизи для прикрепления к эпителиальной поверхности. Это присоединение обычно опосредовано бактериальными волосковыми или бахромчатыми структурами, хотя в этом процессе могут участвовать другие компоненты клеточной поверхности. Прикрепившиеся бактерии колонизируют слизистые эпителии размножением и инициацией ряда биохимических взаимодействий внутри целевой клетки через механизмы трансдукции сигналов (с помощью или без помощи токсинов). Известно большое разнообразие ассоциированных с этими инвазивными механизмами биоадгезивных белков (например, инвазии, интерналин), исходно продуцируемых различными бактериями и вирусами. Они делают возможным экстраклеточное присоединение таких микроорганизмов при впечатляющей селективности по отношению к видам хозяев и даже к конкретным целевым тканям. Сигналы, передаваемые такими рецептор-лигандными взаимодействиями, запускают транспорт интактных живых микроорганизмов в и, в конце концов, через эпителиальные клетки эндо- и транцитоз-

ными способами. Такие встречающиеся в природе феномены можно приспособить (например, образованием комплекса биологически активных агентов, таких как пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, с адгезинами) как указано здесь для способствования доставке биологически активных соединений в или через слизистые эпителии и/или к другим намеченным целевым местам действия лекарственного средства.

Различные бактериальные и растительные токсины, которые связываются с эпителиальными поверхностями специфичным лектиноподобным образом, также являются полезными в способах и композициях по этому изобретению. Например, дифтерийный токсин (ДТ) быстро поступает в хозяйские клетки путем эндоцитоза, опосредованного рецепторами. Аналогично, В-субъединица термоллабильного токсина *E. coli* связывается с ворсинчатой каймой кишечных эпителиальных клеток весьма специфичным лектиноподобным образом. Сообщается о поглощении этого токсина и транцитозе в базолатеральную сторону энтероцитов *in vivo* и *in vitro*. В других исследованиях экспрессировали трансмембранный домен дифтерийного токсина в *E. coli* в виде слитого белка с белком связывания мальтозы и химическим путем соединяли с высокомолекулярным поли-L-лизинном. Получившийся комплекс успешно использовали для опосредования интернализации репортерного гена *in vitro*. Вдобавок к этим примерам, *Staphylococcus aureus* продуцирует набор белков (например, стафилококковый энтеротоксин А (SEA), SEB, токсин-1 синдрома токсического шока (TSST-1), которые действуют и как суперантигены, и как токсины. В исследованиях, связанных с этими белками, сообщается о дозозависимом усиленном транцитозе SEB и TSST-1 в клетки Caco-2.

Вирусные гемагглютинины составляют другой тип транспортных агентов для способствования доставке, осуществляемой через слизистые оболочки, биологически активных агентов в способах и композициях по этому изобретению. Начальной стадией во многих вирусных инфекциях является связывание поверхностных белков (гемагглютининов) с клетками слизистых. Эти связывающиеся белки были идентифицированы для большинства вирусов, в том числе ротавирусов, вируса опоясывающего лишая, вируса леса Семлики, аденовирусов, вируса свертывания листьев картофеля и реовируса. Эти и другие примеры вирусных гемагглютининов можно использовать в комбинационном препарате (например, препарате, представляющем собой смесь или конъюгат) или в протоколе согласованного введения с одним или более из пептидов, связывающихся с Y2-рецепторами, их аналогов и миметиков, описанных здесь, для согласованного способствования доставке, осуществляемой через слизистые оболочки, одного или нескольких из дополнительного(ых) биологически активного(ых) агента(ов). Или же вирусные гемагглютинины можно использовать в комбинационном препарате или протоколе согласованного введения для прямого способствования доставке через слизистые одного или нескольких из белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в сочетании или без сочетания со способствованием доставке дополнительного биологически активного агента.

Множество разных эндогенных, селективных опосредствующих транспорт факторов также является доступным для применения по этому изобретению. Клетки млекопитающего развили ряд механизмов для облегчения интернализации конкретных субстратов и нацеливания их в определенные компартменты. Все вместе эти процессы деформации мембран названы 'эндоцитозом' и включают в себя фагоцитоз, пиноцитоз, опосредованный рецепторами эндоцитоз (ОРЭ) (опосредованный клатрином ОРЭ) и поточитоз (не опосредованный клатрином ОРЭ). ОРЭ является весьма специфичным клеточным биологическим процессом, посредством которого, как подразумевает его название, различные лиганды связываются с рецепторами на поверхности клетки и затем интернализуются и перемещаются в клетке. Во многих клетках процесс эндоцитоза является столь активным, что вся поверхность мембраны подвергается интернализации менее чем за полчаса. Предложены два класса рецепторов на основании их ориентации в клеточной мембране; аминоконец рецепторов типа I находится на экстраклеточной стороне мембраны, тогда как рецепторы типа II имеют тот же конец белка во внутриклеточной среде.

Другие варианты осуществления этого изобретения используют трансферрин в качестве носителя или стимулятора ОРЭ при доставке, осуществляемой через слизистые оболочки, биологически активных агентов. Трансферрин, гликопротеин с молекулярной массой 80 кДа, транспортирующий железо, эффективно захватывается клетками посредством ОРЭ. Рецепторы трансферрина найдены на поверхности большинства пролиферирующих клеток, в повышенном числе на эритроблестах и на многих видах опухолей. Транцитоз трансферрина (Tf) и конъюгатов трансферрина, по сообщениям, усиливается в присутствии брэфелдина А (BFA), грибкового метаболита. В других исследованиях сообщалось, что обработка при использовании BFA быстро увеличивает апикальный эндоцитоз как рибина, так и пероксидазы хрена в клетки MDCK. Таким образом, BFA и другие агенты, которые стимулируют опосредованный рецепторами транспорт, можно использовать в способах по этому изобретению и как скомбинированные (например, конъюгированные), и/или как согласованно вводимые агенты для способствования опосредованному рецепторами транспорту биологически активных агентов, в том числе белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами.

Полимерные средства доставки и способы

В определенных аспектах этого изобретения белки, аналоги и миметики пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, другие биологически активные агенты, которые здесь раскрыты, и агенты, способст-

вующие доставке, как описано выше, индивидуальным или комбинационным образом включают в препарат для доставки через слизистые оболочки (например, через нос), содержащий биосовместимый полимер, функционирующий в качестве носителя или основы. Такие полимерные носители включают в себя, среди других форм, полимерные порошки, матрицы или средства доставки, представляющие собой микрочастицы. Полимер может быть растительного, животного или синтетического происхождения. Часто полимер является поперечно-сшитым. Дополнительно в этих системах доставки пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, аналог или миметик, можно снабдить функциональной группировкой таким образом, что он может быть ковалентно связанным с полимером и стать неотделимым от полимера при простой промывке. В других вариантах осуществления полимер химически модифицируют ингибитором ферментов или других агентов, которые могут разлагать или инактивировать биологически активный(е) агент(ы) и(или) агент(ы), способствующий(е) доставке. В определенных препаратах полимер является частично или полностью нерастворимым в воде, но набухающим в воде полимером, например гидрогелем. Полимеры, полезные в этом аспекте настоящего изобретения, желателно являются взаимодействующими с водой и/или гидрофильными по природе для абсорбции значительных количеств воды, и они часто образуют гидрогели, когда их помещают в контакт с водой или водной средой в течение периода времени, достаточного для достижения равновесия с водой. В более детальных вариантах осуществления полимер является гидрогелем, который при контакте с избытком воды абсорбирует, по меньшей мере, двукратную по его массе массу воды при равновесии, при взаимодействии при комнатной температуре (патент США № 6004583).

Системы доставки лекарственного средства, основанные на биоразлагаемых полимерах, являются предпочтительными во многих биомедицинских приложениях из-за того, что такие системы разрушаются либо гидролизом, либо энзиматической реакцией на нетоксичные молекулы. Скорость деградации контролируют манипулированием составом биоразлагаемого полимерного матрикса. Поэтому эти типы систем можно использовать в определенных условиях для длительного высвобождения биологически активных агентов. Биоразлагаемые полимеры, такие как поли(гликолевая кислота) (PGA), поли(молочная кислота) (PLA) и сополи(D,L-молочная гликолевая кислота) (PLGA), привлекли значительное внимание как возможные средства доставки лекарственного средства, поскольку обнаружено, что продукты деградации этих полимеров имеют низкую токсичность. При нормальных метаболических функциях организма эти полимеры разлагаются в диоксид углерода и воду. Эти полимеры также проявляют прекрасную биосовместимость.

Для продления биологической активности пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, его аналогов и миметиков и других биологически активных агентов, описанные здесь, а также возможных агентов, способствующих доставке, эти агенты можно включать в полимерные матрицы, например полиортоэфиры, полиангидриды или полиэферы. Это дает постоянную активность и высвобождение активного(ых) агента(ов), например, как определяют по деградации полимерной матрицы. Хотя инкапсулирование биотерапевтических молекул внутри синтетических полимеров может стабилизировать их во время хранения и доставки, главным препятствием в технологии высвобождения на основе полимера является потеря активности терапевтических молекул при процессах составления препарата, которые часто включают в себя обработку теплом, ультразвуком или органическими растворителями.

Способствующие абсорбции полимеры, подразумеваемые для применения по этому изобретению, могут включать в себя производные и химически или физически модифицированные версии вышеуказанных типов полимеров, добавок к другим встречающимся в природе или синтетическим полимерам, гумми, смолам и другим агентам, а также смеси этих материалов одного с другим или с другими полимерами, постольку поскольку эти изменения, модификации или смешивание не оказывают нежелательного влияния на желаемые свойства, такие как абсорбция воды, образование гидрогеля и/или химическая стабильность для полезного применения. В более детальных аспектах этого изобретения такие полимеры, как нейлон, акрилан и другие в норме гидрофобные синтетические полимеры, можно в достаточной степени модифицировать взаимодействием так, что они становятся набухающими в воде и/или образуют стабильные гели в водной среде.

Способствующие абсорбции полимеры по этому изобретению могут включать в себя полимеры из группы гомо- и сополимеров, основанных на различных комбинациях нижеследующих виниловых мономеров: акриловая и метакриловая кислоты, акриламид, метакриламид, гидроксипропанакрилат или метакрилат, винилпирролидоны, а также поливиниловый спирт и его со- и терполимеры, поливинилацетат, его со- и терполимеры с вышеперечисленными мономерами и 2-акриламидо-2-метилпропансульфоновая кислота (AMPS®). Очень полезными являются сополимеры вышеперечисленных мономеров с сополимеризуемыми функциональными мономерами, такими как акрил или метакриламидакрилат или метакрилатные эфиры, в которых эфирные группы являются производными алкила с прямой или разветвленной цепью, арила, имеющего до четырех ароматических колец, которые могут содержать алкильные заместители атомов углерода числом от 1 до 6; стероиды, сульфаты, фосфаты или катионные мономеры, такие как N,N-диметиламиноалкил(мет)акриламид, диметиламиноалкил(мет)акрилат, (мет)акрилоксиалкилтриметиламмония хлорид, (мет)акрилоксиалкилдиметилбензиламмония хлорид.

Дополнительными способствующими абсорбции полимерами для применения по этому изобретению являются те, которые классифицируют как декстраны, декстрины, и класс материалов, которые классифицируют как натуральные гумми и смолы, или из класса натуральных полимеров, таких как процессированный коллаген, хитин, хитозан, пуллалан, зооглан, алгинаты и модифицированные алгинаты, такие как "Kelcoloid" (полипропиленгликоль, модифицированный алгинат), геллановые гумми, такие как "Kelocogel", ксантановые гумми, такие как "Keltrol", эстагин, альфа-гидроксibuтират и его сополимеры, гиалуроновая кислота и ее производные, полимолочная и гликолевая кислоты.

Очень полезным классом полимеров, применимых по этому изобретению, являются олефиновым образом ненасыщенные карбоновые кислоты, содержащие по меньшей мере одну активированную олефиновую двойную углерод-углеродную связь и по меньшей мере одну карбоксильную группу, то есть, кислотную или функциональную группу, легко превращаемую в кислоту, содержащую олефиновую двойную связь, которая легко функционирует в полимеризации из-за ее присутствия в мономерной молекуле либо в альфа- или бета-позиции относительно карбоксильной группы, либо в виде части концевой метиленовой группировки. Олефиновым образом ненасыщенные кислоты этого класса включают в себя такие материалы, как акриловые кислоты, типичными представителями которых являются сама акриловая кислота, альфа-цианоакриловая кислота, бета-метилакриловая кислота (кротоновая кислота), альфа-фенилакриловая кислота, бета-акрилоксипропионовая кислота, циннамовая кислота, р-хлорциннамовая кислота, 1-карбокси-4-фенилбутadiен-1,3-итаконная кислота, цитраконовая кислота, мезаконовая кислота, глутаконовая кислота, аконтовая кислота, малеиновая кислота, фумаровая кислота и трикарбоксиэтилен. В данном контексте термин "карбоновая кислота" включает в себя поликарбоновые кислоты и те ангидриды кислоты, такие как малеиновый ангидрид, где ангидридная группа образована элиминацией одной молекулы воды из двух карбоксильных групп, находящихся на одной и той же молекуле карбоновой кислоты.

Представители акрилатов, полезных в качестве способствующих абсорбции агентов по этому изобретению, включают в себя метилакрилат, этилакрилат, пропилакрилат, изопропилакрилат, бутилакрилат, изобутилакрилат, метилметакрилат, метилэтакрилат, этилметакрилат, октилакрилат, гептилакрилат, октилметакрилат, изопропилметакрилат, 2-этилгексилметакрилат, нонилакрилат, гексилакрилат, н-гексилметакрилат и тому подобные. Акриловыми эфирами высшего алкила являются децилакрилат, изодецилметакрилат, лаурилакрилат, стеарилакрилат, бегенилакрилат и мезилилакрилат и их метакрилатные версии. Смеси двойных или тройных или более длинноцепочечных акриловых эфиров можно успешно полимеризовать с одним из карбоксильных мономеров. Другие сомомеры включают в себя олефины, в том числе альфа-олефины, виниловые простые эфиры, виниловые сложные эфиры и их смеси.

Другие винилиденные мономеры, в том числе акриловые нитрилы, также можно использовать в качестве способствующих абсорбции агентов в способах и композициях по этому изобретению для способствования доставке и абсорбции одного или нескольких из белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и других биологически активных агентов, что включает в себя способствование доставке активного(ых) агента(ов) в целевую ткань или компартмент в субъекте (например, печень, портальная вена печени, ткань или жидкость ЦНС, или плазма крови). Полезными альфа, бета-олефиновым образом ненасыщенными нитрилами являются предпочтительно моноолефиновым образом ненасыщенные нитрилы, имеющие от 3 до 10 атомов углерода, такие как акрилонитрил, метакрилонитрил и тому подобные. Наиболее предпочтительными являются акрилонитрил и метакрилонитрил. Также можно использовать акриловые амиды, содержащие от 3 до 35 атомов углерода, в том числе моноолефиновым образом ненасыщенные амиды. Представители амидов включают в себя акриламид, метакриламид, N-трет-бутилакриламид, N-циклогексилакриламид, амиды высших алкилов, в которых алкильная группа на азоте содержит от 8 до 32 атомов углерода, акриловые амиды, включающие в себя N-алкилолаамиды альфа-, бета-олефиновым образом ненасыщенных карбоновых кислот, в том числе тех, которые имеют от 4 до 10 атомов углерода, такие как N-метилолакриламид, N-пропанолакриламид, N-метилолметакриламид, N-метилолмалеимид, сложные эфиры N-метилолмалеамовой кислоты, N-метилол-пара-винил бензамид и тому подобные.

Другими полезными дополнительными материалами, способствующими абсорбции, являются альфа-олефины, содержащие от 2 до 18 атомов углерода, более предпочтительно от 2 до 8 атомов углерода; диены, содержащие от 4 до 10 атомов углерода; сложные виниловые эфиры и аллиловые сложные эфиры, такие как винилацетат; эфиры винила с ароматическим соединением, таким как стирол, метилстирол и хлорстирол; виниловые и аллиловые простые эфиры и кетоны, такие как винилметилловый простой эфир и метилвинилкетон; хлоракилаты; цианоалкилакрилаты, такие как альфа-цианометилакрилат, и альфа-, бета- и гамма-цианопрпилакрилаты; алкоксиакрилаты, такие как метоксизетилакрилат; галогеноакрилаты, такие как хлорэтилакрилат; винилгалогениды и винилхлорид, винилиденхлорид и тому подобные; дивинилы, диакрилаты и другие полифункциональные мономеры, такие как дивиниловый простой эфир, диэтиленгликольдиакрилат, этиленгликольдиакрилат, метилен-бис-акриламид, аллилпентаэритритол и тому подобные; и бис(бета-галогеноалкил)алкенилфосфонаты, такие как бис(бета-хлорэтил)винилфосфонат и тому подобные, в той степени, насколько известно специалистам. Сополиме-

ры, в которых карбоксисодержащий мономер является минорной составной частью, и другие винилиденные мономеры, присутствующие в качестве главных компонентов, легко получать в соответствии со способами, которые здесь раскрыты.

Когда в качестве агентов, способствующих абсорбции, по этому изобретению используют гидрогели, их можно получать из синтетических сополимеров из группы акриловых и метакриловых кислот, акриламида, метакриламида, гидроксиэтилакрилата (HEA) или метакрилата (HEMA) и винилпирролидонов, которые являются взаимодействующими с водой и набухающими. Конкретными иллюстративными примерами полезных полимеров, особенно для доставки пептидов или белков, являются нижеследующие типы полимеров: (мет)акриламид и (мет)акриловая кислота от 0,1 до 99 мас.%; (мет)акриламиды и (мет)акрилоксиэтилтриметиламмония хлорид от 0,1 до 75 мас.%; (мет)акриламид и (мет)акриламид от 0,1 до 75 мас.%; акриловая кислота и алкил(мет)акрилаты от 0,1 до 75 мас.%; (мет)акриламид и AMPS.RTM (торговая марка Lubrizol Corp.) от 0,1 до 75% мас.%; (мет)акриламид и алкил(мет)акриламиды от 0 до 30 мас.% и AMPS.RTM от 0,1 до 75 мас.%; (мет)акриламид и HEMA от 0,1 до 99 мас.%; (мет)акриламид и HEMA от 0,1 до 75 мас.% и (мет)акриловая кислота от 0,1 до 99%; (мет)акриловая кислота и HEMA от 0,1 до 99 мас.%; 50 моль-% винилового простого эфира и 50 моль-% малеинового ангидрида; (мет)акриламид и от 0,1 до 75 мас.% хлорида (мет)акрилоксиалкилдиметилбензил-аммония; (мет)акриламид и от 0,1 до 99 мас.% винилпирролидона; (мет)акриламид и 50 мас.% винилпирролидона и от 0,1 до 99,9 мас.% (мет)акриловой кислоты; (мет)акриловая кислота и 0,1-75 мас.% AMPS.RTM; и 0,1-75 мас.% алкил(мет)акриламид. В вышеуказанных примерах алкил означает линейный и разветвленный от C₁ до C₃₀, предпочтительно от C₁ до C₂₂, и циклический от C₄ до C₁₆; термин (мет) означает, что охватываются мономеры с метильной группой и без метильной группы. Другими очень полезными полимерами, представляющими собой гидрогели, являются набухающие, но нерастворимые версии поли(винилпирролидон)ового крахмала, карбоксиметилцеллюлозы и поливинилового спирта.

Дополнительные полимерные материалы, представляющие собой гидрогели, полезные по этому изобретению, включают в себя (поли)гидроксиалкил(мет)акрилат; анионные и катионные гидрогели; полиэлектролитные комплексы; поли(виниловые спирты) имеющие низкий остаточный ацетат; набухающая смесь перекрестно сшитого агара и перекрестно-сшитой карбоксиметилцеллюлозы; набухающая композиция, содержащая метилцеллюлозу, смешанную со слабо поперечно-сшитым агаром; набухающий в воде сополимер, получаемый диспергированием тонкоизмельченного сополимера малеинового ангидрида со стиролом, этиленом, пропиленом или изобутиленом; набухающий в воде полимер N-виниллактамов; набухающие натриевые соли карбоксиметилцеллюлозы и тому подобное.

Другие гелеобразующие пропитываемые жидкостью и удерживающие жидкость полимеры, полезные для образования гидрофильных гидрогелей для доставки через слизистые биологически активных агентов по этому изобретению, включают в себя пектин; полисахариды, такие как агар, гуммиарабик, карайя, трагакант, алгины и гуар и их поперечно-сшитые версии; производные акриловой кислоты, представляющие собой полимеры, сополимеры и соль, полиакриламиды; набухающие в воде полимеры инденмалеинового ангидрида; сополимеры с привитым крахмалом; полимеры и сополимеры акрилатного типа со способностью абсорбировать воду в количестве от около двукратного до в 400 раз большего, чем их исходная масса; диэфиры полиглюкана; смесь поперечно-сшитого полимера винилового спирта и полимера N-винил-2-пирролидона; гели, представляющие собой блочный полиоксибутилен-полиэтиленовый сополимер, гумми цератонии, гели, представляющие собой полимеры простых эфиров; полимочевинные гели; гели, представляющие собой полимеры простых эфиров; полиамидные гели; полиимидные гели; полипептидные гели; полиаминокислотные гели; полицеллюлозные гели; поперечно-связанные полимеры инденмалеинового ангидрида и акрилата; и полисахариды.

Синтетические полимеры, представляющие собой гидрогель, для применения по этому изобретению можно получать бесчисленными комбинациями нескольких мономеров в нескольких соотношениях. Гидрогель может быть поперечно-сшитым и обычно обладает способностью впитывать и абсорбировать жидкость и набухать или расширяться до расширенного равновесного состояния. Гидрогель в типичных случаях разбухает или расширяется при доставке на слизистую поверхность носовой полости, абсорбируя массу воды, которая примерно в 2-5, в 5-10, в 10-50, до 50-100 раз и в большее число раз больше его собственной массы. Оптимальная степень набухающей способности для данного гидрогеля должна быть определена для разных биологически активных агентов в зависимости от таких факторов, как молекулярная масса, размер, характеристики растворимости и диффузии активного агента, переносимого или заключенного или инкапсулированного в этом полимере, и конкретных промежутков между цепями и их кооперативной подвижностью в каждом индивидуальном полимере.

Гидрофильные полимеры, полезные по этому изобретению, являются нерастворимыми в воде, но набухающими в воде. Такие набухающие в воде полимеры обычно называют гидрогелями или гелями. Такие гели можно удобно получать из водорастворимых полимеров способом поперечного сшивания этих полимеров подходящим агентом поперечного сшивания. Однако стабильные гидрогели можно также формировать из конкретных полимеров в определенных условиях pH, температуры и/или концентрации ионов в соответствии со способами, известными в данной области. В типичных случаях полимеры являются поперечно-сшитыми, то есть поперечно-сшитыми до степени, в которой эти полимеры облада-

ют хорошими гидрофильными свойствами, имеют улучшенную физическую целостность (при сравнении с не поперечно-сшитыми полимерами того же типа) и проявляют улучшенную способность удерживать в пределах сетчатой структуры геля как биологически активный агент, представляющий интерес, так и дополнительные соединения для совместного введения с ним, такие как ингибитор цитокина или фермента, в то же время сохраняя способность высвобождения активного агента(ов) в надлежащем месте и в нужное время.

Обычно полимеры, представляющие собой гидрогель, для применения по этому изобретению являются поперечно-сшитыми с дифункциональными поперечными сшивками при количестве агента поперечного сшивания от 0,01 до 25 мас.% на основании массы мономеров, образующих этот сополимер, и более предпочтительно от 0,1 до 20 мас.% и более часто от 0,1 до 15 мас.%. Другим полезным количеством агента поперечного сшивания является от 0,1 до 10 мас.%. Можно также использовать агенты поперечного сшивания, имеющие три-, тетра или более высокую степень multifункциональности. При использовании таких реагентов меньшие количества могут требоваться для достижения эквивалентной плотности поперечного сшивания, то есть степени поперечного сшивания или свойств сетчатой структуры, которые являются достаточными для эффективного содержания биологически активного(ых) агента(ов).

Поперечные сшивки могут быть ковалентными, ионными или водородными связями с полимером, обладающим способностью набухать в присутствии жидкостей, содержащих воду. Такие поперечные сшиватели и поперечно-сшивающие взаимодействия известны специалистам в данной области и во многих случаях являются зависимыми от полимерной системы. Таким образом, сетчатую структуру поперечных сшивок можно формировать свободнорадикальной сополимеризацией ненасыщенных мономеров. Полимерные гидрогели можно также формировать поперечным сшиванием предварительно сформированных полимеров взаимодействием с функциональными группами, находящимися на этих полимерах, такими как спирты, кислоты, амины, с такими группами, как глиоксаль, формальдегид или глутаральдегид, бис-ангидриды и тому подобные.

Полимеры также можно поперечно сшивать любым полиеном, например декадиеном или тривинилциклогексаном; акриламидами, такими как N,N-метилен-бис (акриламид); полифункциональными акрилатами, такими как триметилпропантриакрилат; или полифункциональными винилиденовыми мономерами, содержащими по меньшей мере 2 концевые группы $\text{CH}_2<$, в том числе, например, дивинилбензолом, дивинилнафталином, аллилакрилатами и тому подобным. В определенных вариантах осуществления поперечно-сшивающими мономерами для применения в получении сополимеров являются полиалкениловые полиэфиры, имеющие более чем одну из алкенильных эфирных группировок на молекулу, которые возможно могут содержать алкенильные группы, в которых присутствует олефиновая двойная связь при концевой метиленовой группировке (например, полученные этерификаций многоатомного спирта, содержащего по меньшей мере 2 атома углерода и по меньшей мере 2 гидроксильные группы). Соединения этого класса можно получать взаимодействием алкенилгалогенида, такого как аллилхлорид или аллилбромид, с сильно щелочным водным раствором одного или нескольких из полиатомных спиртов. Этот продукт может быть также комплексной смесью полимеров простых эфиров с варьирующими числами групп, представляющих собой простой эфир. Эффективность агента поперечного сшивания образованием простых эфиров увеличивается с числом потенциально полимеризуемых групп на молекуле. В типичных случаях используют полиэфиры, содержащие в среднем две или более чем две эфирные группы с алкенилом на молекулу. Другие поперечно-сшитые мономеры включают в себя, например, диаллиловые сложные эфиры, диметаллиловые простые эфиры, аллил- или металлилакрилаты и акриламиды, тетравинилсилан, полиалкенилметаны, диакрилаты и диметакрилаты, дивинильные соединения, такие как дивинилбензол, полиаллилфосфат, диаллилксисоединения и фосфитовые сложные эфиры и тому подобные. Типичными агентами являются аллилпентаэритритол, аллилсахароза, триметилпропантриакрилат, 1,6-гександиолдиакрилат, триметилпропандиаллиловый простой эфир, пентаэритритолтриакрилат, тетраметилендиметакрилат, этилендиакрилат, этилендиметакрилат, триэтиленгликольдиметакрилат и тому подобные. Аллилпентаэритритол, триметилпропандиаллилпростой эфир и аллилсахароза дают подходящие полимеры. При наличии агента поперечного сшивания полимерные смеси обычно содержат приблизительно от 0,01 до 20 мас.%, например, 1, 5, или 10 или более чем 10 мас.% поперечно-сшивающего мономера по сумме мономеров, являющегося карбоновой кислотой, и других мономеров.

В более детальных аспектах этого изобретения доставке, осуществляемой через слизистые оболочки, пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, аналогов и миметиков и других биологически активных агентов, которые здесь раскрыты, способствуют удержанием активного(ых) агента(ов) в носителе для медленного высвобождения или ферментатически или физиологически защитном носителе, например гидрогеле, который экранирует активный агент от действия разлагающих ферментов. В определенных вариантах осуществления активный агент связывают химическими способами с носителем или средством доставки, с которым можно также смешать или связать дополнительные агенты, такие как ингибиторы фермента, цитокины и т.д. Или же активный агент можно иммобилизовать достаточным физическим заключением в носителе или средстве доставки, например полимерном матриксе.

Полимеры, такие как гидрогели, полезные по этому изобретению, могут включать функциональные связанные агенты, такие как гликозиды, химически включенные в полимер для способствования биологической доступности смешанных с ними активных агентов при введении через нос. Примерами таких гликозидов являются глюкозиды, фруктозиды, галактозиды, арабинозиды, маннозиды и их алкилзамещенные производные и натуральные гликозиды, такие как арбутин, флоризин, амигдалин, дигитонин, сапонин и инидикан. Есть несколько путей, которыми типичный гликозид можно связать с полимером. Например, водород гидроксильных групп гликозида или другого похожего углеводорода можно заменять алкильной группой из полимера гидрогеля с образованием простого эфира. Также можно проводить взаимодействие гидроксильных групп гликозидов с карбоксильными группами сложных эфиров в полимерном гидрогеле с образованием полимерных сложных эфиров *in situ*. Другим подходом является использование конденсации ацетобромглюкозы с холест-5-ен-3β-олом на сополимере малеиновой кислоты. N-замещенные полиакриламидами можно синтезировать взаимодействием активированных полимеров с омега-аминоалкилгликозидами: (1) (углеводород-спейсер)(n)-полиакриламид, “псевдополисахариды”; (2) (углеводород-спейсер)(n)-фосфатидилэтанолламин(m)-полиакриламид, неогликолипиды, производные фосфатидилэтанолламина; (3) (углеводород-спейсер)(m)-биотин(m)-полиакриламид. Эти биотинилированные производные могут прикрепляться к лектинам на слизистой поверхности для облегчения абсорбции биологически активного(ых) агента(ов), например инкапсулированного в полимер пептида, связывающегося с Y2-рецепторами.

В более детальных аспектах этого изобретения один или несколько пептидов, связывающихся с Y2-рецепторами, их аналогов и миметиков и/или других биологически активных агентов, описанных здесь, возможно, включающие в себя активные вторичные агенты, такие как ингибитор(ы) протеазы, цитокин(ы), дополнительный(е) модулятор(ы) физиологии межклеточных стыков и т.д., модифицируют и связывают с полимерным носителем или матриксом. Например, это можно осуществлять химическим связыванием активного агента, представляющего собой пептид или белок, и другого(их) возможного(ых) агента(ов) в пределах сетчатой структуры поперечно-сшитого полимера. Также возможно химически модифицировать полимер отдельно взаимодействующим агентом, таким как молекула, содержащая гликозидаль. В определенных аспектах биологически активный(е) агент(ы) и возможно вторичный(е) активный(е) агент(ы) можно функционализировать, то есть к активному(ым) агенту(ам) химически присоединить или идентифицировать на нем надлежащую активную группу. Наиболее часто присоединяют этиленовую полимеризуемую группу, и затем функционализированный активный агент сополимеризуют с мономерами и агентом поперечного сшивания при использовании стандартного способа полимеризации, такого как полимеризация в растворе (обычно в воде), эмульсии, суспензии или дисперсии. Часто функционализирующий агент используют при достаточно высокой концентрации функциональных или полимеризуемых групп, чтобы гарантировать то, что несколько точек на активном(ых) агенте(ах) являются функционализированными. Например, в полипептиде, содержащем 16 точек, представляющих собой амин, обычно желательно функционализировать по меньшей мере 2, 4, 5, 7 и до 8 или более этих точек.

После функционализации функциональный(е) активный(е) агент(ы) смешивают с мономерами и поперечно-сшивающим агентом, который содержит реагенты, из которых образуется полимер, представляющий интерес. Затем индуцируют полимеризацию в этой среде для создания полимера, содержащего связанный(е) активный(е) агент(ы). Этот полимер затем промывают водой или другими надлежащими растворителями и иным образом очищают для удаления следов непрореагировавших примесей и, если необходимо, перемалывают или измельчают физическими способами, такими как перемешивание, продавливание через сетку, обработка ультразвуком или другими способами, подходящими для желаемого размера частиц. Растворитель, обычно воду, затем удаляют таким образом, чтобы не денатурировать или иным образом не разрушить активный(е) агент(ы). Предпочтительным способом является лиофилизация (сублимационная сушка), но есть и другие способы, которые можно использовать (например, вакуумную сушку, воздушную сушку, распылительную сушку и т.д.).

Для введения полимеризуемых групп в пептиды, белки и другие активные агенты по этому изобретению можно проводить взаимодействие доступных аминных, гидроксильных, тиольных и других активных групп с электрофилами, содержащими ненасыщенные группы. Например, к этой категории реагентов принадлежат ненасыщенные мономеры, содержащие N-гидроксисукцинимидильные группы, активные карбонаты, такие как p-нитрофенилкарбонат, трихлорфенилкарбонаты, трезилат, оксикарбонилимидазолы, эпоксид, изоцианаты и альдегид и ненасыщенные карбоксиметилазиды и ненасыщенный ортопиридилдисульфид. Показательными примерами ненасыщенных реагентов являются аллилглицидиловый простой эфир, аллилхлорид, аллилбромид, аллилйодид, акрилоилхлорид, аллилизотиоцианат, аллилсульфонилхлорид, малеиновый ангидрид, сополимеры малеинового ангидрида и аллильного простого эфира и тому подобные.

Все производные, активные по отношению к лизину, кроме альдегида, могут обычно взаимодействовать с другими аминокислотами, такими как имидазольные группы гистидина и гидроксильные группы тирозина и тиольные группы цистеина, если локальная среда способствует нуклеофильности этих групп. Альдегидсодержащие функционализирующие реагенты являются специфичными по отношению к

лизину. Эти типы взаимодействий с доступными группами из лизинов, цистеинов, тирозина, были подробно документированы в литературе и известны специалистам.

В случае биологически активных агентов, которые содержат аминокислоты, удобно проводить взаимодействие таких групп с ацилоилхлоридом как акрилоилхлорид и вводить полимеризуемую акриловую группу в подвергнутый взаимодействию агент. Затем во время получения полимера путем поперечного сшивания сополимера акриламида и акриловой кислоты, функционализирующий активный агент через акриловые группы присоединяют к полимеру, и он становится связанным с ним.

В дополнительных аспектах этого изобретения биологически активные агенты, в том числе пептиды, белки, нуклеозиды и другие молекулы, которые являются биоактивными *in vivo*, стабилизируют конъюгацией при ковалентном связывании одного или нескольких из активных агентов с полимером, включающим в качестве его интегральной части как гидрофильную группировку, например линейный полиалкиленгликоль, так и липофильную группировку (см., например, патент США № 5681811). В одном аспекте биологически активный агент ковалентно сочетает с полимером, содержащим (i) линейную полиалкиленгликолевую группировку и (ii) липофильную группировку, причем активный агент, линейная полиалкиленгликолевая группировка и липофильная группировка являются конформационно расположенными одна относительно другой так, что активный терапевтический агент имеет *in vivo* улучшенную устойчивость к энзиматической деградации (то есть, относительно его стабильности в сходных условиях в неконъюгированной форме, лишенной связанного с ним полимера). В другом аспекте стабилизированный конъюгацией препарат имеет трехмерную конформацию, включающую в себя биологически активный агент, ковалентно связанный с полисорбатным комплексом, содержащим (i) линейную полиалкиленгликолевую группировку и (ii) липофильную группировку, причем активный агент, линейная полиалкиленгликолевая группировка и липофильная группировка конформационно расположены одна относительно другой так, что (a) липофильная группировка является в трехмерной конформации доступный извне и (b) активный агент в композиции имеет *in vivo* улучшенную устойчивость к энзиматической деградации.

В дополнительном связанном аспекте предложен мультилигандный конъюгированный комплекс, который содержит биологически активный агент, ковалентно связанный с триглицеридной скелетной группировкой через полиалкиленгликолевую спейсерную группу, присоединенную по углеродному атому триглицеридной скелетной группировки, и, по меньшей мере, одну жирнокислотную группировку, либо ковалентно присоединенную прямо к углеродному атому триглицеридной скелетной группировки, либо ковалентно присоединенную через полиалкиленгликолевую спейсерную группировку (см., например, патент США № 5681811). В таком комплексе, являющемся мультилигандным конъюгированным терапевтическим агентом, альфа- и бета-атомы углерода триглицеридной биоактивной группировки могут иметь жирнокислотные группировки, либо присоединенные ковалентным связыванием прямо в нем, либо ковалентно присоединенные к ним непрямо через полиалкиленгликолевые спейсерные группировки. Или же жирнокислотную группировку можно ковалентно присоединять либо прямо, либо через полиалкиленгликолевую спейсерную группировку к альфа- и альфа'-атомам углерода триглицеридной скелетной группировки, причем биоактивный терапевтический агент ковалентно сочетается с гамма-углеродом триглицеридной скелетной группировки, будучи либо прямо ковалентно связанным с ней, либо непрямо связанным с ней через полиалкиленовую спейсерную группировку. Надо понимать, что в пределах объема этого изобретения возможно обширное множество разных структурных, композиционных и конформационных форм для комплекса, являющегося мультилигандным конъюгированным терапевтическим агентом, который содержит триглицеридную скелетную группировку. Далее следует отметить, что в пределах объема этого изобретения в таком комплексе, являющемся мультилигандным конъюгированным терапевтическим агентом, биологически активный(е) агент(ы) можно с выгодой ковалентно связывать с триглицеридной модифицированной скелетной группировкой через алкильные спейсерные группы или, альтернативно, другие приемлемые спейсерные группы. При использовании в таком контексте приемлемость спейсерных групп относится к стерическим, композиционным и специфическим для окончательного применения характеристикам приемлемости.

В других дополнительных аспектах этого изобретения предложен стабилизированный конъюгацией комплекс, который содержит полисорбатный комплекс, содержащий полисорбатную группировку, включающую в себя триглицеридный скелет, имеющий ковалентно связанные с его альфа-, альфа'- и бета-атомами углерода функционализирующие группы, в том числе (i) жирнокислотную группу и (ii) полиэтиленгликолевую группу, имеющую биологически активный агент или группировку, которая ковалентно связана с ней, например связана с надлежащей функциональной группировкой полиэтиленгликолевой группы. Такое ковалентное связывание может быть либо прямым, например с гидроксиконцевой функциональной группировкой полиэтиленгликолевой группы, или же ковалентное связывание может быть непрямым, например при реактивном кэшировании гидроксильного конца полиэтиленгликолевой группы концевой функциональной карбоксильной спейсерной группой, таким, что получившаяся прикрытая полиэтиленгликолевая группа имеет концевую карбоксильную функциональную группировку, с которой можно ковалентно связать биологически активный агент или группировку.

В других дополнительных аспектах этого изобретения предложен стабильный водорастворимый, стабилизированный конъюгацией комплекс, который содержит один или несколько белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и(или) других биологически активных агентов, описанных здесь, причем он(и) ковалентно сочетается(ются) с физиологически совместимой гликолипидной группировкой, модифицированной полиэтиленгликолем (ПЭГ). В таком комплексе биологически активный(е) агент(ы) можно ковалентно связывать с физиологически совместимой ПЭГ-модифицированной гликолипидной группировкой лабильной ковалентной связью по свободной аминокислотной группе активного агента, причем лабильная ковалентная связь является расщепляемой *in vivo* при биохимическом гидролизе и/или протеолизе. Физиологически совместимая ПЭГ-модифицированная гликолипидная группировка может преимущественно содержать полисорбатный полимер, например полисорбатный полимер, содержащий группировки, представляющие собой сложные эфиры жирной кислоты, выбираемые из группы, состоящей из монопальмитата, дипальмитата, монолаурата, дилаурата, трилаурата, моноолеата, диолеата, триолеата, моностеарата, дистеарата и тристеарата. В таком комплексе физиологически совместимая ПЭГ-модифицированная гликолипидная группировка может подходящим образом содержать полимер, выбранный из группы, состоящей из простых эфиров полиэтиленгликоля с жирными кислотами и сложных эфиров полиэтиленгликоля с жирными кислотами, причем жирные кислоты, например, содержат жирную кислоту, выбираемую из группы, состоящей из лауриновой, пальмитиновой, олеиновой и стеариновой кислот.

Хранение материала

В определенных аспектах этого изобретения комбинационные препараты и/или способы согласованного введения включают эффективное количество пептидов и белков, которые могут прилипать к заряженному стеклу, тем самым снижая эффективную концентрацию в контейнере. Для хранения готового продукта с целью снижения адсорбции полипептида или белка к стеклянному контейнеру используют силанизированные контейнеры, например контейнеры из силанизированного стекла.

В других дополнительных аспектах этого изобретения набор для лечения субъекта, представляющего собой млекопитающее, содержит стабильную фармацевтическую композицию одного или нескольких из соединений, представляющих собой пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, введенных в состав для доставки через слизистые оболочки субъекту, представляющему собой млекопитающее, причем эта композиция является эффективной для облегчения одного или нескольких из симптомов ожирения, рака, или нарушения питания или похудения, связанных с раком, у вышеуказанного субъекта без неприемлемых нежелательных побочных эффектов. Этот набор дополнительно содержит флакон для фармацевтического реагента для вмещения одного или нескольких из соединений, представляющих собой пептид, связывающийся с Y2-рецепторами. Флакон для фармацевтического реагента состоит из полимера, стекла или другого подходящего материала, имеющего фармацевтическое качество. Флаконом для фармацевтического реагента является, например, флакон из силанизированного стекла. Этот набор дополнительно содержит апертуру для доставки композиции на слизистую оболочку носа субъекта. Апертура для доставки состоит из полимера, стекла или другого подходящего материала, имеющего фармацевтическое качество. Апертура для доставки состоит, например, из силанизированного стекла.

Методика силанизации комбинирует специальную методику очистки поверхностей, подлежащих силанизации, со способом силанизации при низком давлении. Силан находится в газовой фазе и при повышенной температуре поверхностей, подлежащих силанизации. Этот способ обеспечивает воспроизводимые поверхности со стабильными, гомогенными и функциональными слоями силана, имеющими характеристики монослоя. По данному изобретению, силанизированные поверхности предотвращают связывание полипептидов или агентов, способствующих доставке через слизистые, со стеклом.

Эта процедура является полезной для получения силанизированных флаконов для фармацевтического реагента с целью вмещения композиций пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, по данному изобретению. Стеклянные лотки до использования чистят ополаскиванием дважды дистиллированной водой (ddH_2O). Лоток для силана ополаскивают 95% EtOH и лоток для ацетона ополаскивают ацетоном. Флаконы для фармацевтического реагента обрабатывают в ацетоне ультразвуком в течение 10 мин. После обработки ультразвуком в ацетоне флаконы для реагента промывают в лотке с ddH_2O по меньшей мере, дважды. Флаконы для реагента обрабатывают ультразвуком в 0,1M NaOH в течение 10 мин. В то время как флаконы для реагента обрабатывают ультразвуком в NaOH, готовят под вытяжкой раствор силана. (Раствор силана 800 мл 95%-ного этанола; 96 л ледяной уксусной кислоты; 25 мл глицидокси-пропилтриметоксисилана). После обработки ультразвуком в NaOH флаконы для реагента промывают в лотке с ddH_2O по меньшей мере дважды. Флаконы для реагента обрабатывают ультразвуком в растворе силана от 3 до 5 мин. Флаконы для реагента промывают в лотке с 100%-ным EtOH. Флаконы для реагента сушат предварительно очищенным газом N_2 и держат в воздушном термостате при 100°C по меньшей мере 2 ч до использования.

Биоадгезивные средства доставки и способы

В определенных аспектах этого изобретения комбинационные препараты и/или способы согласованного введения включают эффективное количество нетоксичного биоадгезивного агента в качестве вспомогательного соединения или носителя для способствования доставке, осуществляемой через слизи-

стые оболочки, одного или нескольких из биологически активных агентов. Биоадгезивные агенты в этом контексте проявляют общую или специфичную адгезию к одному или более из компонентов или поверхностей целевой слизистой оболочки. Биоадгезивный агент поддерживает желаемый градиент концентрации биологически активного агента внутрь или поперек слизистой оболочки для обеспечения проникновения даже крупных молекул (например, пептидов и белков) в (через) слизистый эпителий. В типичных случаях использование биоадгезивного агента в способах и композициях по этому изобретению дает двух-пятикратное, часто пятидесятикратное увеличение проницаемости для пептидов и белков в (через) слизистый эпителий. Это способствование эпителиальной проницаемости часто делает возможной эффективную доставку, осуществляемую через слизистые оболочки, крупных макромолекул, например, к базальной части эпителия носовой полости, или в прилегающие внеклеточные компартменты, или в плазму крови, или в ткань или жидкость ЦНС.

Эта усовершенствованная доставка делает возможной повышение эффективности доставки биоактивных пептидов, белков и других макромолекулярных терапевтических веществ. Эти результаты зависят частично от гидрофильности соединения, из-за чего большее проникновение должно быть достигнуто с гидрофильными веществами по сравнению с нерастворимыми в воде соединениями. Вдобавок к этим эффектам использование биоадгезивных агентов для способствования удержанию лекарственного средства при слизистой поверхности может создать резервуарный механизм для продленной доставки лекарственного средства, из-за чего соединения не только проникают через слизистую ткань, но также диффундируют назад к поверхности слизистой оболочки, как только материал на поверхности оказывается исчерпанным.

Множество разных подходящих биоадгезивных агентов описано в данной области для перорального введения (патенты США № 3972995; 4259314; 4680323; 4740365; 4573996; 4292299; 4715369; 4876092; 4855142; 4250163; 4226848; 4948580; патент США повторный выпуск 33093), причем они находят применение в новых способах и композициях по этому изобретению. Потенциал различных биоадгезивных полимеров в качестве платформы для доставки через слизистые оболочки, например через нос, в способах и композициях по этому изобретению можно легко оценить определением их способности удерживать и высвобождать пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, а также по их способности взаимодействовать со слизистыми поверхностями после включения в них активного агента. Кроме того, для определения биосовместимости выбранных полимеров с тканью в месте введения через слизистые применяют хорошо известные способы. Когда целевая слизистая оболочка покрыта слизью (то есть, в отсутствие муколитической или удаляющей слизь обработки), она может служить в качестве соединительного звена с лежащим под ней слизистым эпителием. Поэтому, термин "биоадгезивный" в данном контексте также охватывает мукоадгезивные соединения, полезные для способствования доставке, осуществляемой через слизистые оболочки, биологически активных агентов по этому изобретению. Однако адгезивный контакт со слизистой тканью, опосредованный адгезией к слою слизевого геля, может быть ограничен неполным или кратковременным соединением между слоем слизи и находящейся под ним тканью, особенно на поверхностях носовой полости, где происходит быстрое выведение слизи. В этой связи, муциновые гликобелки являются постоянно секретируемыми, и немедленно после их высвобождения из клетки или железы они образуют вязкоэластичный гель. Обращенная к полости поверхность этого слоя липкого геля, однако, постоянно нарушается механически, ферментатически и(или) действием ресничек. Если такие активности являются более выраженными или если желательным является более долгое время адгезии, способы согласованного введения и способы комбинационного препарата по этому изобретению могут дополнительно включать муколитические и(или) цилиостатические способы или агенты как описано здесь выше.

В типичных случаях мукоадгезивные полимеры для применения по этому изобретению являются натуральными или синтетическими макромолекулами, которые прилипают к влажным поверхностям слизистой ткани посредством сложных, но неспецифичных механизмов. Вдобавок к этим мукоадгезивным полимерам это изобретение также предлагает способы и композиции, которые включают биоадгезивные агенты, которые прилипают прямо к поверхности клетки, а не к слизи, посредством специфичных взаимодействий, включающих в себя взаимодействия, опосредованные рецепторами. Одним примером биоадгезивных агентов, которые функционируют этим специфичным образом, является группа соединений, известных как лектины. Они являются гликобелками со способностью специфично распознавать и связывать молекулы сахара, например, в гликобелках или гликолипидах, которые формируют часть мембран эпителиальных клеток в носовой полости и могут считаться "рецепторами лектинов".

В определенных аспектах этого изобретения биоадгезивные материалы для способствования интраназальной доставке биологически активных агентов содержат матрикс из гидрофильного, например растворимого или набухающего в воде, полимера или из смеси полимеров, который может прилипать к влажной слизистой поверхности. Эти адгезивные агенты можно вводить в состав мазей, гидрогелей (см. выше), тонких пленок и других форм нанесения. Часто эти адгезивные агенты содержат смешанный с ними биологически активный агент для осуществления медленного высвобождения или локальной доставки активного агента. Некоторые из них вводят в состав с дополнительными ингредиентами для облег-

чения проникновения активного агента через слизистую оболочку полости носа, например, в систему кровообращения индивида.

Различные полимеры, как натуральные, так и синтетические, демонстрируют значительное связывание со слизью и/или слизистыми эпителиальными поверхностями в физиологических условиях. Силу этого взаимодействия можно легко измерять тестами механического отслаивания или сдвига. При нанесении на влажную слизистую поверхность многие сухие материалы спонтанно прилипают, по меньшей мере, слегка. После такого начального контакта некоторые гидрофильные материалы начинают привлекать воду адсорбцией, набуханием или капиллярными силами, и, если эта вода абсорбируется из находящегося ниже субстрата или из промежутка между полимером и тканью, адгезия может быть достаточной для достижения цели способствования абсорбции биологически активных агентов слизистой. Такая “адгезия гидратацией” может быть весьма сильной, но препараты, адаптированные к использованию этого механизма, должны учитывать набухание, которое продолжается по мере того, как доза трансформируется в гидратированное клейкое вещество. Это предусмотрено для многих гидроколлоидов, полезных по этому изобретению, особенно для некоторых целлюлозных производных, которые обычно являются неадгезивными при нанесении в предварительно гидратированном состоянии. Тем не менее, системы доставки биоадгезивного лекарственного средства для введения через слизистые оболочки являются эффективными по этому изобретению, когда такие материалы наносят в форме сухого полимерного порошка, микросфер или в форме доставки пленочного типа.

Другие полимеры прилипают к слизистым поверхностям не только при нанесении в сухом виде, но также в полностью гидратированном состоянии и в присутствии избыточных количеств воды. Выбор мукоадгезивных агентов, таким образом, требует должного учета условий, как физиологических, так и физико-химических, в которых формируется и поддерживается контакт с тканью. В частности, количество воды или влажность, обычно присутствующая в намеченном месте адгезии, и преобладающая величина pH, известны как главным образом влияющие на силу мукоадгезивного связывания разных полимеров.

Несколько полимерных биоадгезивных систем доставки лекарственного средства были изготовлены и изучены в последние 20 лет, не всегда успешно. Множество разных таких носителей, однако, используется в настоящее время в клинических приложениях, что включает в себя применение в стоматологии, ортопедии, офтальмологии и хирургии. Например, гидрогели на акриловой основе широко использовались для биоадгезивных устройств. Гидрогели на акриловой основе хорошо пригодны к биоадгезии из-за их гибкости и неабразивных свойств в частично набухом состоянии, которые снижают повреждающее истирание тканей при контакте. Более того, их высокая проницаемость в набухом состоянии делает возможным вымывание из матрикса после полимеризации непрореагировавшего мономера, не поперечно-сшитых цепей полимера и инициатора, что является важной особенностью для отбора биоадгезивных материалов в целях применения по этому изобретению. Полимерные устройства на акриловой основе проявляют очень высокую силу адгезивной связи. Для контролируемой доставки, осуществляемой через слизистые оболочки, пептидных и белковых лекарственных средств способы и композиции по этому изобретению возможно включают в себя применение носителей, например полимерных средств доставки, которые функционируют отчасти экранированием биологически активного агента от протеолитического разрушения, в то же время делая возможным способствование проникновению пептида или белка в (через) слизистую мембрану носовой полости. В этом контексте биоадгезивные полимеры показали значительный потенциал для способствования пероральной доставке лекарственного средства. Например, биологическая доступность 9-дезглицинамид-8-аргининазопрессина (DGAVP), введенного крысам в двенадцатиперстную кишку вместе с 1%-ной (масса/объем) дисперсией мукоадгезивного производного поли(акриловая кислоты) поликарбофила в физрастворе, увеличивалась в 3-5 раз по сравнению с водным раствором этого пептидного лекарственного средства без этого полимера.

Мукоадгезивные полимеры типа полимера акриловой кислоты являются сильнодействующими ингибиторами некоторых кишечных протеаз. Механизм ингибирования фермента объясняют сильным сродством этого класса полимеров к дивалентным катионам, таким как кальций или цинк, которые являются необходимыми кофакторами металлобелка, таких как трипсин и химотрипсин. Сообщалось, что лишение протеаз их кофакторов полимером акриловой кислоты индуцирует в белках фермента необратимые структурные изменения, которые сопровождаются потерей активности фермента. В то же время, другие мукоадгезивные полимеры (например, некоторые производные целлюлозы и хитозан) могут не ингибировать протеолитические ферменты в определенных условиях. В отличие от абсорбции других ингибиторов фермента, подразумеваемых для применения по этому изобретению, (например, аprotинина, бестатина), которые являются относительно малыми молекулами, абсорбция через носовую полость ингибиторных полимеров, вероятно, является минимальной, ввиду размера этих молекул, и тем самым элиминирует возможные нежелательные побочные эффекты. Таким образом, мукоадгезивные полимеры, особенно типа полимеров акриловой кислоты, могут служить в качестве агентов, способствующих абсорбции, адгезивных и защищающих от фермента, для способствования контролируемой доставке пептидных и белковых лекарственных средств, особенно когда учитываются вопросы безопасности.

Вдобавок к защите от ферментной деградации биоадгезивные агенты и другие полимерные или непolyмерные агенты, способствующие абсорбции, для применения по этому изобретению могут прямо увеличивать проницаемость слизистых для биологически активных агентов. Постулировано, что для облегчения транспорта крупных и гидрофильных молекул, таких как пептиды и белки, через эпителиальный барьер носовой полости мукоадгезивные полимеры и другие агенты вызывают эффекты, способствующие проникающей способности, помимо тех, которые ответственны за продленное время удержания системы доставки до слизистой. Из сообщений о зависимости концентрации лекарственного средства в плазме от времени следует, что биоадгезивные микросферы вызывают острое, но преходящее увеличение проникновения инсулина через слизистую оболочку носовой полости. Другие мукоадгезивные полимеры для применения по этому изобретению, например хитозан, по сообщениям, усиливают проницаемость определенных слизистых эпителиев даже при нанесении в виде водного раствора или геля. Другими мукоадгезивными полимерами, о которых сообщают, что они прямо влияют на эпителиальную проницаемость, являются гиалуроновая кислота и ее сложноэфирные производные. Особенно полезным биоадгезивным агентом в способах и составах, представляющих собой согласованное введение и/или комбинационный препарат и композиции, по этому изобретению является хитозан, а также его аналоги и производные. Хитозан является нетоксичным, биосовместимым и биоразлагаемым полимером, который широко используют в фармацевтических и медицинских целях из-за его благоприятных свойств, представляющих собой низкую токсичность и хорошую биосовместимость. Он является натуральным полиаминосахаридом, который получают из хитина N-деацетилизацией щелочью. При использовании в способах и композициях по этому изобретению хитозан увеличивает удержание белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и других биологически активных агентов, описанных здесь, в месте нанесения на слизистые оболочки. Этот способ введения может также улучшить прием и соблюдение режима лечения пациентом. Как предложено здесь дополнительно, способы и композиции по этому изобретению могут, возможно, включать в себя новое производное хитозана или химически модифицированную форму хитозана. Одно такое новое производное для применения по этому изобретению обозначают как полимер β -[1 $\rightarrow$ 4]-2-гуанидино-2-дезоксид-D-глюкозы (поли-GuD). Хитозан является N-деацетилизированным продуктом хитина, встречающегося в природе полимера, который широко использовали в получении микросфер для пероральных и интраназальных препаратов. Полимер хитозан также был предложен в качестве растворимого носителя для парентеральной доставки лекарственного средства. В одном аспекте этого изобретения используют о-метилизомочевину для превращения амина хитозана в его гуанидиниевую группировку. Гуанидиниевое соединение получают, например, взаимодействием между эквинормальными растворами хитозана и о-метилизомочевины при pH выше 8,0.

Гуанидиниевый продукт является полимером -[14]-гуанидино-2-дезоксид-D-глюкозы. В данном контексте его сокращают как Поли-GuD (F.W. мономера амина в хитозане = 161; F.W. мономера гуанидиния в Поли-GuD = 203).

Один пример способа получения Поли-GuD для применения по этому изобретению включает в себя нижеследующий протокол.

Растворы

Получение 0,5%-ного раствора уксусной кислоты (0,088 н)

Пипеткой берут 2,5 мл ледяной уксусной кислоты в мерную колбу на 500 мл, разбавляют до метки очищенной водой.

Получение 2 н раствора NaOH

Переносят около 20 г гранул NaOH в химический стакан с около 150 мл очищенной воды. Растворяют и охлаждают до комнатной температуры. Переносят раствор в 250-мл мерную колбу, разбавляют до метки очищенной водой.

Получение сульфата О-метилизомочевины (эквивалентного 0,4 н по мочевиным группам)

Переносят около 493 мг сульфата О-метилизомочевины в 10-мл мерную колбу, растворяют и разбавляют до метки очищенной водой.

Величина pH раствора составляет 4,2.

Получение раствора хлорида бария (0,2 М)

Переносят около 2,086 г хлорида бария в 50-мл мерную колбу, растворяют и разбавляют до метки очищенной водой.

Получение раствора хитозана (эквивалентного 0,06 н по амину)

Переносят около 100 мг хитозана в 50-мл химический стакан, добавляют 10 мл 0,5%-ной уксусной кислоты (0,088 н). Перемешивают до полного растворения.

Величина pH раствора составляет около 4,5.

Получение раствора хлорида О-метилизомочевины (эквивалентного 0,2 н по мочевиным группам)

Пипеткой берут 5,0 мл раствора сульфата О-метилизомочевины (эквивалентного 0,4 н по мочевиным группам) и 5 мл раствора 0,2 М хлорида бария в химический стакан. Образуется осадок. Продолжают перемешивать раствор в течение дополнительных 5 мин. Фильтруют раствор через фильтр с диамет-

ром пор 0,45 мкм и отбрасывают осадок. Концентрация хлорида О-метилизомочевины в супернатантном растворе эквивалентна 0,2 н по мочевиным группам.

Величина pH раствора составляет 4,2.

Процедура

Добавляют 1,5 мл 2 н NaOH к 10 мл раствора хитозана (эквивалентного 0,06 н по амину), приготовленному как описано в секции 2.5. Доводят pH раствора 2 н гидроксидом натрия приблизительно до 8,2-8,4. Перемешивают раствор в течение дополнительных 10 мин. Добавляют 3,0 мл раствора хлорида О-метилизомочевины (эквивалентного 0,2 н по мочевиным группам), приготовленного как описано выше. Перемешивают раствор в течение ночи.

Доводят pH раствора до 5,5 0,5%-ной уксусной кислотой (0,088 н). Разбавляют раствор до конечного объема 25 мл очищенной водой. Концентрация Поли-GuD в растворе составляет 5 мг/мл, эквивалентна 0,025 н (по гуанидиниевым группам).

Дополнительные соединения, классифицируемые как биоадгезивные агенты для применения по данному изобретению, действуют опосредованием специфичных взаимодействий, в типичных случаях классифицируемых как "рецептор-лигандные взаимодействия", между комплементарными структурами соединения, представляющего собой биоадгезивный агент, и компонентом поверхности слизистого эпителия. Многие натуральные примеры иллюстрируют эту форму биоадгезии специфичным связыванием, примером чему являются взаимодействия между лектином и сахаром. Лектины являются (глико)белками неиммунного происхождения, которые связываются с полисахаридами или гликоконъюгатами.

Несколько растительных пектинов были исследованы как возможные фармацевтические способствующие абсорбции агенты. Один растительный лектин, гемагглютинин из *Phaseolus vulgaris* (PHA), проявляет высокую пероральную биологическую доступность, составляющую более чем 10% после скормливания крысам. Лектин томатов *Ly-copersicon esculentum* (TL) оказывается безопасным при различных способах введения.

В общем, вышеуказанные биоадгезивные агенты являются полезными в комбинационных препаратах и способах согласованного введения по этому изобретению, которые возможно включают эффективное количество и форму биоадгезивного агента для продления удержания или иного увеличения абсорбции, осуществляющейся через слизистые, одного или нескольких белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и других биологически активных агентов. Биоадгезивные агенты можно согласованно вводить в качестве вспомогательных соединений или добавок в комбинационные препараты по этому изобретению. В определенных вариантах осуществления биоадгезивный агент действует в качестве "фармацевтического клея", в то время как в других вариантах осуществления вспомогательная доставка или комбинационный препарат биоадгезивного агента служит для интенсификации контакта биологически активного агента со слизистой оболочкой носовой полости, в некоторых случаях, способствованием специфичным рецептор-лигандным взаимодействиям с "рецепторами" на эпителиальной клетке и, в других случаях, увеличением эпителиальной проницаемости для значительного увеличения градиента концентрации лекарственного средства, измеренного в целевом месте доставки (например, в печени, плазме крови или ткани или жидкости ЦНС). Дополнительные биоадгезивные агенты для применения по этому изобретению действуют как ингибиторы фермента (например, протеазы) для способствования стабильности биотерапевтических агентов, вводимых через слизистые, доставляемых согласованно или в комбинационном препарате с биоадгезивным агентом.

Липосомы и мицеллярные средства доставки

Способы согласованного введения и комбинационные препараты по этому изобретению, возможно, включают эффективные основанные на липидах или жирных кислотах носители, агенты процессинга или средства доставки для получения улучшенных препаратов для доставки, осуществляемой через слизистые оболочки, белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и других биологически активных агентов. Например, предложено множество разных препаратов и способов для доставки через слизистые оболочки, содержащих один или несколько активных агентов, таких как пептид или белок, в смеси или при согласованном введении с липосомой, смешанным мицеллярным носителем или эмульсией, или при инкапсулировании в них, для способствования химической и физической стабильности и для увеличения периода полужизни биологически активных агентов (например, снижением подверженности протеолизу, химической модификации и(или) денатурации) при доставке через слизистые оболочки.

В определенных аспектах этого изобретения специализированные системы доставки для биологически активных агентов содержат мелкие липидные везикулы, известные как липосомы. Их в типичных случаях получают из молекул натурального, биоразлагаемого, нетоксичного и неиммуногенного липида, и они могут эффективно вмещать или связывать молекулы лекарственного средства, в том числе пептиды и белки, в (на) их мембранах. Привлекательность липосом в качестве систем доставки пептида и белка по этому изобретению повышает тот факт, что инкапсулированные белки могут оставаться в их предпочтительно водной среде в пределах этих везикул, в то время как липосомальная мембрана защищает их от протеолиза и других дестабилизирующих факторов. Даже хотя не все известные способы получения липосом являются осуществимыми при инкапсулировании пептидов и белков из-за их уникальных физи-

ческих и химических свойств, несколько способов делают возможным инкапсулирование этих макромолекул без существенной инактивации.

Имеется целый ряд способов получения липосом для применения по этому изобретению (патенты США № 4235871, 4501728 и 4837028). Для применения при доставке липосомами биологически активный агент в типичных случаях заключают в пределы липосомы или липидной везикулы или связывают с внешней стороной везикулы.

Подобно липосомам, ненасыщенные длинноцепочечные жирные кислоты, которые также имеют активность, способствующую абсорбции через слизистые оболочки, могут образовывать замкнутые везикулы с бислойподобной структурой (так называемые "уфасомы"). Их можно формировать, например, при использовании олеиновой кислоты для вмещения биологически активных пептидов и белков для доставки через слизистые оболочки, например через нос, по этому изобретению.

Другие системы доставки для применения по этому изобретению, такие как инкапсулирование внутри натурального полимера фибрина, комбинируют применение полимеров и липосом для объединения полезных свойств обоих носителей. Кроме того, высвобождение биотерапевтического соединения из этой системы доставки является контролируемым при применении ковалентного поперечного сшивания и при добавлении антифибринолитических агентов к полимеру фибрина.

Более упрощенные системы доставки для применения по этому изобретению включают в себя применение катионных липидов в качестве средств доставки или носителей, которые можно эффективно использовать путем электростатических взаимодействий между липидным носителем и такими заряженными биологически активными агентами, как белки и полианионные нуклеиновые кислоты. Это делает возможным эффективное приготовление лекарственных средств в форме, подходящей для введения через слизистые и(или) последующей доставки в системные компартменты.

Дополнительные средства доставки для применения по этому изобретению включают в себя длинно- и среднецепочечные жирные кислоты, а также смешанные мицеллы из поверхностно-активных агентов с жирными кислотами. Большинство встречающихся в природе липидов в форме сложных эфиров имеют важные особенности в отношении их собственного транспорта через слизистые поверхности. Было показано, что свободные жирные кислоты и их моноглицериды, имеющие присоединенные полярные группы, в форме смешанных мицелл действуют на кишечный барьер как агенты, способствующие проникновению. Это открытие модифицирующих барьер функций свободных жирных кислот (карбоновых кислот с длиной цепи, варьирующей от 12 до 20 атомов углерода) и их полярных производных стимулировало широкие исследования по применению этих агентов в качестве агентов, способствующих абсорбции через слизистые оболочки.

Для применения в способах по этому изобретению длинноцепочечные жирные кислоты, особенно фузогенные липиды (ненасыщенные жирные кислоты и моноглицериды, такие как олеиновая кислота, линоленовая кислота, линоленовая кислота, моноолеин и т.д.) представляют собой полезные носители для способствования доставке, осуществляемой через слизистые оболочки, пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, аналогов и миметиков и других биологически активных агентов, которые здесь раскрыты. Было показано, что среднецепочечные жирные кислоты (от C6 до C12) и моноглицериды также имеют активность, способствующую кишечной абсорбции лекарственного средства, и их можно адаптировать для применения в препаратах и способах для доставки через слизистые оболочки по этому изобретению. Вдобавок, натриевые соли средне- и длинноцепочечных жирных кислот являются эффективными средствами доставки и способствующими абсорбции агентами для доставки, осуществляемой через слизистые оболочки, биологически активных агентов по этому изобретению. Таким образом, жирные кислоты можно использовать в растворимой форме, представляющей собой натриевые соли, или при добавлении нетоксичных поверхностно-активных агентов, например полиоксиэтилированного гидрогенированного касторового масла, таурохолата натрия и т.д. Другие жирнокислотные и смешанные мицеллярные препараты, которые являются полезными по этому изобретению, включают в себя, однако не ограничиваются ими, каприлат (C 8) Na, капрат (C 10) Na, лаурат (C 12) Na или олеат (C 18) Na, возможно комбинированные с солями желчных кислот, такими как гликохолат и таурохолат.

Пэгирование

Дополнительные способы и композиции, предложенные по этому изобретению, включают в себя химическую модификацию биологически активных пептидов и белков ковалентным присоединением полимерных материалов, например декстранов, поливинилпирролидонов, гликопептидов, полиэтиленгликоля и полимеров аминокислот. Получившиеся конъюгированные пептиды и белки сохраняют их биологические активности и растворимости для введения через слизистые оболочки. В альтернативных вариантах осуществления белки, аналоги и миметики пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и другие биологически активные пептиды и белки конъюгируют с полиалкиленоксидными полимерами, особенно полиэтиленгликолями (ПЭГ) (патент США №4179337).

Полимеры, представляющие собой взаимодействующие с амином ПЭГ, для применения по этому изобретению включают в себя SC-ПЭГ с молекулярными массами 2000, 5000, 10000, 12000 и 20000; U-ПЭГ-10000; NHS-ПЭГ-3400-биотин; T-ПЭГ-5000; T-ПЭГ-12000 и TPC-ПЭГ-5000. Пэгирование биологически активных пептидов и белков можно достигать модификацией карбоксильных точек (например,

групп, представляющих собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту, вдобавок к карбоксильному концу). Было описано применение ПЭГ-гидразида в селективной модификации карбодиимид-активированных карбоксильных групп белка в кислых условиях. Также можно использовать бифункциональную ПЭГ-модификацию биологически активных пептидов и белков. В некоторых процедурах заряженные аминокислотные остатки, в том числе лизин, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота, имеют выраженную склонность быть доступными растворителю на поверхностях белка.

Другие стабилизирующие модификации активных агентов

Вдобавок к ПЭГилированию возможна модификация биологически активных агентов, таких как пептиды и белки, для применения по этому изобретению, для способствования увеличения периода полужизни в циркуляции экранированием активного агента конъюгацией с другими известными защищающими или стабилизирующими соединениями, например созданием слитых белков с активным пептидом, белком, аналогом или миметиком, связанных с одним или несколькими из белков-носителей, таких как одна или несколько цепей иммуноглобулина.

Составление препарата и введение

Препараты для доставки через слизистые по данному изобретению содержат пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, аналоги и миметики, в типичных случаях в комбинации с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, и, возможно, другими терапевтическими ингредиентами. Носитель(и) должен(ны) быть "фармацевтически приемлемым(и)" в смысле совместимости с другими ингредиентами препарата и не вызывания неприемлемых пагубных эффектов в субъекте. Такие носители раскрыты здесь выше или являются иным образом хорошо известными специалистам в фармакологии. Желательно, чтобы препарат не включал в себя такие вещества, как ферменты или окислители, для которых известна несовместимость с вводимым биологически активным агентом. Препараты можно получать любым из способов, хорошо известных в данной области фармацевтики.

В композициях и способах по этому изобретению белки, аналоги и миметики пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и другие биологически активные агенты, которые здесь раскрыты, можно вводить субъектам многими разными способами введения через слизистые оболочки, в том числе пероральным, ректальным, вагинальным, интраназальным, внутрилегочным способом, или путем трансдермальной доставки, или местной доставки в глаза, уши, кожу или другие слизистые поверхности. Возможно, белки, аналоги и миметики пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и другие биологически активные агенты, которые здесь раскрыты, можно согласованным или вспомогательным образом вводить не через слизистые пути, а, например, внутримышечным, подкожным, внутривенным, внутриартериальным, внутрисуставным, внутрибрюшинным или парентеральным путем. В других альтернативных вариантах осуществления биологически активный(е) агент(ы) можно вводить *ex vivo* прямой экспозицией клеткам, тканям или органам, происходящим из субъекта, представляющего собой млекопитающее, например в качестве компонента препарата для лечения ткани или органа *ex vivo*, который содержит биологически активный агент в подходящем жидком или твердом веществе-носителе.

Композиции в соответствии с данным изобретением часто вводят в водном растворе в качестве носового или легочного спрея, и их можно дозировать в форме спрея многими различными способами, известными специалистам. Предпочтительные системы для дозирования жидкости в качестве интраназального спрея раскрыты в патенте США № 4511069. Препараты могут присутствовать в многодозовых контейнерах, например в герметичных дозирующих системах, раскрытых в патенте США № 4511069. Дополнительные формы аэрозольной доставки могут включать в себя, например, работающие на сжатом воздухе, струйные, ультразвуковые и пьезоэлектрические распылители, которые доставляют биологически активный агент, растворенный или суспендированный в фармацевтическом растворителе, например воде, этаноле или их смеси.

Растворы для интраназального или внутрилегочного спрея по данному изобретению в типичных случаях содержат лекарственное средство или лекарственное средство, подлежащее доставке, которое может быть введено в состав с поверхностно-активным агентом, таким как неионный поверхностно-активный агент (например, полисорбат-80), и одним или несколькими буферными агентами. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения растворы для интраназального спрея дополнительно содержат газ-выталкиватель. Величина pH раствора для интраназального спрея может составлять от 3,0 до 6,0, предпочтительно $5,0 \pm 0,3$. Подходящие буферные агенты для применения в этих композициях описаны выше или иным образом известны в данной области. Для повышения или поддержания химической стабильности можно добавлять другие компоненты, в том числе консерванты, поверхностно-активные агенты, диспергаторы или газы. Подходящие консерванты включают в себя, без ограничения, фенол, метилпарабен, парабен, м-крезол, тиомерсал, хлорбутанол, хлорид бензалкония и тому подобные вещества. Подходящие поверхностно-активные агенты включают в себя, но не ограничиваются, олеиновой кислотой, триолеатом сорбитана, полисорбатами, лецитинами, фосфатидилхолинами и различными длинноцепочечными диглицеридами и фосфолипидами. Подходящие диспергаторы включают в себя, но не ограничиваются, этилендиаминтетрауксусной кислотой и тому подобными веществами. Подходящие газы включают в себя, но не ограничиваются, азотом, гелием, хлорфторуглеродами (CFC), гидрофторуглеродами (HFC), диоксидом углерода, воздухом и тому подобными газами.

В альтернативных модификациях препараты для доставки через слизистые оболочки вводят в виде сухих порошковых препаратов, содержащих биологически активный агент в сухой, обычно лиофилизированной, форме с частицами надлежащего размера или в пределах надлежащего диапазона размеров частиц для интраназальной доставки. Минимальный размер частиц, подходящий для отложения в носовых или легочных проходах, составляет около 0,5 мкм по средневзвешенному эквивалентному аэродинамическому диаметру (MMEAD), обычно около 1 мкм MMEAD и, в более типичных случаях, около 2 мкм MMEAD. Максимальный размер частиц, подходящий для отложения в носовых проходах, составляет около 10 мкм MMEAD, обычно около 8 мкм MMEAD и, в более типичных случаях, около 4 мкм MMEAD. Вдыхаемые через нос порошки в пределах этих диапазонов размеров можно получать многими разными общепринятыми методиками, такими как струйное измельчение, распылительная сушка, преципитация из растворителя, конденсация сверхкритической жидкости и тому подобными методиками. Эти сухие порошки с надлежащим MMEAD можно вводить пациенту через традиционный порошковый ингалятор (DPI), который основан на дыхании пациента, легочной или интраназальной ингаляцией при диспергировании порошка в аэрозолируемом количестве. Также сухой порошок можно вводить пневматическими устройствами, которые используют внешний источник энергии для диспергирования порошка в аэрозолируемом количестве, например поршневым насосом.

Устройства с сухим порошком в типичных случаях требуют массы порошка в диапазоне приблизительно от 1 до 20 мг, чтобы получить одну аэрозольную дозу ("понюшку"). Если требуемая или желаемая доза биологически активного агента ниже, чем это количество, порошковый активный агент в типичных случаях надо комбинировать с фармацевтическим сухим порошковым наполнителем, дающим требуемую суммарную массу порошка. Предпочтительные сухие порошковые наполнители включают в себя сахарозу, лактозу, декстрозу; маннит, глицин, трегалозу, человеческий сывороточный альбумин (HSA) и крахмал. Другие подходящие сухие порошковые наполнители включают в себя целлобиозу, декстраны, мальтотриозу, пектин, цитрат натрия, аскорбат натрия и тому подобные вещества.

Для составления композиций для доставки через слизистые оболочки по данному изобретению биологически активный агент можно комбинировать с различными фармацевтически приемлемыми добавками, а также основой или носителем для дисперсии активного(ых) агента(ов). Желаемые добавки включают в себя, но не ограничиваются, агентами контроля pH, такими как аргинин, гидроксид натрия, глицин, соляная кислота, лимонная кислота и т.д. Кроме этого, можно добавлять местные анестетики (например, бензиловый спирт), изотонизирующие агенты (например, хлорид натрия, маннит, сорбит), ингибиторы адсорбции (например, Tween 80), агенты, солюбилизующие (например, циклодекстрины и их производные), стабилизаторы (например, сывороточный альбумин) и восстановители (например, глутатион). Когда композиция для доставки через слизистые является жидкостью, тоничность препарата при измерении относительно тоничности 0,9%-ного (масса/объем) физиологического раствора, взятой за единицу, в типичных случаях доводят до значения, при котором не должно вызываться существенное необратимое повреждение ткани слизистой оболочки носовой полости в месте введения. Обычно тоничность раствора доводят до величины приблизительно от 1/3 до 3, в более типичных случаях от 1/2 до 2 и, наиболее часто, от 3/4 до 1,7.

Биологически активный агент можно диспергировать в основе или носителе, который может содержать гидрофильное соединение, имеющее способность диспергировать активный агент и любую желаемую добавку. Основу можно выбирать из широкого диапазона подходящих носителей, включающих в себя, но не ограничивающихся ими, сополимеры поликарбоновых кислот или их солей, карбоновые ангидриды (например, малеиновый ангидрид) с другими мономерами (например, метил(мет)акрилатом, акриловой кислотой и т.д.), гидрофильные полимеры винила, такие как поливинилацетат, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, производные целлюлозы, такие как гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, и т.д., и натуральные полимеры, такие как хитозан, коллаген, альгинат натрия, желатин, гиалуроновая кислота и ее нетоксичные соли с металлом. Часто в качестве основания или носителя выбирают биоразлагаемый полимер, например полимолочную кислоту, сополимер молочной кислоты и гликолевой кислоты, полигидроксимасляную кислоту, сополимер гидроксимасляной кислоты и гликолевой кислоты и их смеси. Как альтернативный или дополнительный вариант можно использовать в качестве носителей синтетические жирнокислотные сложные эфиры, такие как сложные эфиры полиглицерина и жирной кислоты, сложные эфиры сахарозы и жирной кислоты и т.д. Гидрофильные полимеры и другие носители можно использовать в отдельности или в комбинации, и структурной целостности носителя можно способствовать частичной кристаллизацией, образованием ионных связей, поперечным сшиванием и тому подобным. Носитель может быть во многих различных формах, включая жидкость или вязкие растворы, гели, пасты, порошки, микросферы и пленки для прямого нанесения на слизистую мембрану носовой полости. Применение выбранного носителя в этом контексте может способствовать абсорбции биологически активного агента.

Биологически активный агент можно комбинировать с основой или носителем в соответствии со многими разными способами, и высвобождение активного агента может происходить за счет диффузии, дезинтеграции носителя или ассоциированного образования водных каналов. В некоторых обстоятельствах активный агент диспергируется в микрокапсулах (микросферах) или нанокapsулах (наносферах),

полученных из подходящего полимера, например изобутил-2-цианоакрилата, и диспергируется в биосовместимой диспергирующей среде, нанесенной на слизистую оболочку носовой полости, что обеспечивает постоянную доставку и биологическую активность в течение длительного времени.

Для дополнительного способствования доставке, осуществляемой через слизистые оболочки, фармацевтических агентов по этому изобретению, препараты, содержащие активный агент, могут также содержать гидрофильное низкомолекулярное соединение в качестве основы или наполнителя. Такие гидрофильные низкомолекулярные соединения обеспечивают среду прохождения, через которую активный водорастворимый агент, такой как физиологически активный пептид или белок, может диффундировать через основу на поверхность организма, где абсорбируется активный агент. Гидрофильное соединение с низким молекулярным весом может абсорбировать влагу из слизистой оболочки или атмосферы введения и растворяет активный водорастворимый пептид. Молекулярная масса гидрофильного низкомолекулярного соединения составляет обычно не больше чем 10000 и предпочтительно не больше чем 3000. Примеры гидрофильных низкомолекулярных соединений включают в себя полиольные соединения, такие как олиго-, ди- и моносахариды, такие как сахароза, маннит, сорбит, лактоза, L-арабиноза, D-эритроза, D-рибоза, D-ксилоза, D-манноза, трегалоза, D-галактоза, лактулоза, целлобиоза, гентибиоза, глицерин и полиэтиленгликоль. Другие примеры гидрофильных соединений с низким молекулярным весом, полезных в качестве носителей по этому изобретению, включают в себя N-метилпирролидон и спирты (например, олиговиниловый спирт, этанол, этиленгликоль, пропиленгликоль и т.д.) Эти гидрофильные соединения с низким молекулярным весом можно использовать по отдельности или в комбинации друг с другом или с другими активными или неактивными компонентами интраназального препарата.

Или же композиции по этому изобретению могут содержать в качестве фармацевтически приемлемых носителей вещества, которые требуются для приближения к физиологическим условиям, такие как устанавливающие pH и буферизующие агенты, устанавливающие тоничность агенты, смачивающие агенты и тому подобные, например ацетат натрия, лактат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, монолаурат сорбитана, олеат триэтаноламина и т.д. Для твердых композиций можно использовать общепринятые нетоксичные фармацевтически приемлемые носители, например фармацевтического качества маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарат натрия, тальк, целлюлозу, глюкозу, сахарозу, карбонат магния и тому подобные вещества.

Терапевтические композиции для введения биологически активного агента можно также вводить в состав раствора, микроэмульсии или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации активных ингредиентов. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть растворов можно поддерживать, например, применением покрытия, такого как лецитин, поддержанием желаемого размера частиц в случае диспергируемых препаратов, а также применением поверхностно-активных агентов. Во многих случаях желательно вводить в композицию агенты изотоничности, например сахара, полиспирты, такие как маннит и сорбит, или хлорид натрия. Продленная абсорбция биологически активного агента может быть осуществлена привнесением в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, солей, представляющих собой моностеарат, и желатина.

В определенных вариантах осуществления этого изобретения биологически активный агент вводят в препарат, имеющий определенное время высвобождения, например в композицию, которая включает в себя полимер для медленного высвобождения. Активный агент можно приготавливать с носителями, которые будут защищать от быстрого высвобождения, например с носителем для контролируемого высвобождения, таким как полимер, микроинкапсулированная система доставки или биоадгезивный гель. Продленную доставку активного агента в различных композициях по этому изобретению можно осуществлять путем введения в композицию агентов, которые замедляют абсорбцию, например, гидрогелей моностеарата алюминия или желатина. Когда желаемыми являются препараты для контролируемого высвобождения биологически активного агента, связующие агенты для контролируемого высвобождения, подходящие для применения в соответствии с этим изобретением, включают в себя любой биосовместимый материал для контролируемого высвобождения, который является инертным по отношению к активному агенту и способен включать этот биологически активный агент. Многочисленные материалы такого рода известны в данной области. Полезными связующими агентами для контролируемого высвобождения являются материалы, которые медленно метаболизируются в физиологических условиях после их интраназальной доставки (например, на слизистой поверхности полости носа или в присутствии жидкостей тела после доставки через слизистые оболочки). Надлежащие связующие агенты включают в себя, не ограничиваясь ими, биосовместимые полимеры и сополимеры, которых ранее использовались в данной области в препаратах для постоянного высвобождения. Такие биосовместимые соединения являются нетоксичными и инертными для окружающих тканей и не вызывают значительные нежелательные побочные эффекты, такие как раздражение носовой полости, иммунные реакции, воспаление или тому подобные последствия. Они метаболизируются в метаболические продукты, которые также являются биосовместимыми и легко удаляемыми из организма.

Примеры полимерных материалов для применения в этом контексте включают в себя, не ограничиваясь ими, полимерные матрицы, производимые из сополимерных и гомополимерных полиэфиров, имеющих гидролизующиеся сложноэфирные связи. Многие из них известны в данной области как биоразлагаемые с образованием продуктов разложения, которые являются нетоксичными или имеющими низкую токсичность. Примеры полимеров включают в себя полигликолевые кислоты (PGA) и полимолочные кислоты (PLA), сополимеры DL-молочной кислоты и гликолевой кислоты (DL PLGA), сополимеры D-молочной кислоты и гликолевой кислоты (D PLGA) и сополимеры L-молочной кислоты и гликолевой кислоты (L PLGA). Другие полезные биоразлагаемые или биоразрушаемые полимеры включают в себя, не ограничиваясь ими, такие полимеры, как поли(эпсилон-капролактон), поли(эпсилон-капролактон-СО-молочная кислота), поли(ε-капролактон-СО-гликолевая кислота), поли(бета-гидроксимасляная кислота), поли(алкил-2-цианоакрилат), гидрогели, такие как поли(гидроксиэтилметакрилат), полиамиды, полимеры аминокислот (то есть, L-лейцина, глутаминовой кислоты, L-аспарагиновой кислоты и тому подобных), полимеры сложных эфиров мочевины, поли(2-гидроксиэтил-DL-аспартамид), полимеры, представляющие собой полиацеталь, полиортоэфиры, поликарбонат, полималеимиды, полисахариды и их сополимеры. Специалистам известно много способов получения таких препаратов. Другие полезные препараты включают композиции для контролируемого высвобождения, например микрокапсулы (патенты США № 4652441 и 4917893), сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, полезные в получении микрокапсул и других препаратов (патенты США № 4677191 и 4728721), и композиции для постоянного высвобождения водорастворимых пептидов (патент США № 4675189).

Стерильные растворы можно получать введением активного соединения в требуемом количестве в надлежащий растворитель с одним из или с комбинацией из ингредиентов, перечисленных выше, в зависимости от стоящей задачи, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно получают дисперсии активного соединения в стерильном носителе, который содержит основную среду дисперсии и другие требуемые ингредиенты из числа вышеуказанных. В случае стерильных порошков способы получения включают в себя вакуумную сушку и сублимационную сушку, которая дает порошок активного ингредиента плюс любых дополнительных желаемых ингредиентов из их предварительно стерилизованного фильтрованием раствора. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, сорбиновой кислотой, тимеросалем и тому подобными.

Введение через слизистые оболочки в соответствии с этим изобретением делает возможным эффективное самолечение пациентов, при том условии, что имеют место достаточные предохранительные меры для контроля и мониторинга дозировки и побочных эффектов. Введение через слизистые оболочки также преодолевает определенные недостатки других форм введения, такие как инъекции, которые являются болезненными и подвергают пациента возможности инфекций и могут создавать проблемы биологической доступности лекарственного средства. Для доставки через нос и легкие хорошо известными являются системы для контролируемого дозирования аэрозоля терапевтических жидкостей в виде спрея. В одной модификации отмеренные дозы активного агента доставляют посредством специально сконструированного механического помпового клапана (патент США № 4511069).

Дозировка

Для целей профилактики и лечения биологически активный(е) агент(ы) из числа раскрытых здесь можно вводить субъекту разовой доставкой, длительной доставкой (например, длительной чрескожной доставкой, осуществляемой через слизистые, или внутривенной доставкой) на протяжении длительного периода времени, или по протоколу повторяющихся введений (например, по ежечасному, ежедневному или еженедельному протоколу повторяющихся введений). В этом контексте терапевтически эффективная дозировка биологически активного(ых) агента(ов) может включать в себя повторные дозы в режиме длительной профилактики или лечения, который должен давать клинически значимые результаты для облегчения одного или нескольких симптомов или детектируемых состояний, ассоциированных с целевым заболеванием или с состоянием как указано выше. Определение эффективных дозировок в этом контексте, как правило, основано на исследованиях модели, представляющей собой животное, за которыми следуют клинические испытания на людях, и его направляет определение эффективных дозировок и протоколов введения, которые значительно снижают частоту наличия или тяжесть симптомов целевого заболевания или состояния у субъекта. Подходящие модели в этой связи включают в себя, например, мышей, крыс, свиней, кошек, приматов, не являющихся человеком, и других принятых субъектов, которые являются модельными животными, известными в данной области. Или же эффективные дозировки можно определять при использовании моделей *in vitro* (например, иммунологические и гистопатологические анализы). При использовании таких моделей, как правило, требуются только обычные вычисления и корреляции для определения надлежащей концентрации и дозы для введения терапевтически эффективного количества биологически активного(ых) агента(ов) (например, количество, который является эффективным при введении через нос, эффективным при введении через кожу, эффективным при внутривенном введении или эффективным при внутримышечном введении для достижения желаемого результата).

Реальная дозировка биологически активных агентов, разумеется, будет варьироваться в соответствии с такими факторами, как показания по заболеванию и конкретный статус субъекта (например, возраст субъекта, его размер, физическое состояние, выраженность симптомов, факторы подверженности и т.д.), время и путь введения, другие вводимые одновременно лекарственные средства или средства лечения, а также конкретная фармакология биологически активного(ых) агента(ов), вызывающего(их) желаемую активность или биологический ответ у субъекта. Режимы дозировки можно регулировать для обеспечения оптимального профилактического или терапевтического ответа. Терапевтически эффективным количеством является также такое, при котором любые токсичные или разрушительные побочные эффекты биологически активного агента перевешиваются в клиническом смысле терапевтическими благотворными эффектами. Неограничивающим диапазоном для терапевтически эффективного количества Y2-агониста в способах и препаратах по этому изобретению является диапазон от 0,7 до около 25 мкг/кг. Для способствования потере массы интраназальную дозу пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, вводят в дозе, достаточно высокой, чтобы способствовать сытости, но достаточно низкой, чтобы не индуцировать любые нежелательные побочные эффекты, такие как тошнота. Предпочтительная интраназальная доза РУУ₃₋₃₆ составляет приблизительно от 1 мкг до 10 мкг/кг массы пациента, наиболее предпочтительно от 1,5 до 3 мкг/кг массы пациента. В стандартной дозе пациент должен получить от 50 до 1600 мкг, более предпочтительно приблизительно между 75 и 800 мкг, наиболее предпочтительно 100, 150, 200 и до 400 мкг. Или же, неограничивающий диапазон для терапевтически эффективного количества биологически активного агента в способах и препаратах по этому изобретению составляет приблизительно от 0,001 до 100 пикомолей на кг массы тела, приблизительно от 0,01 до 10 пикомолей на кг массы тела, приблизительно от 0,1 до 5 пикомолей на кг массы тела или приблизительно от 0,5 до 1,0 пикомолей на кг массы тела. Дозировки в пределах этого диапазона можно достигать разовыми или многократными введениями, включающими в себя, например, неоднократные введения в день, ежедневные или еженедельные введения. За одно введение желательно вводить среднему субъекту, являющемуся человеком, по меньшей мере 1 мкг биологически активного агента (например, одного или нескольких из белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, и других биологически активных агентов), в более типичных случаях приблизительно от 10 мкг до 5,0 мг и, в определенных вариантах осуществления приблизительно от 100 мкг до 1,0 или 2,0 мг. Для определенных пероральных приложений высокие дозы до 0,5 мг на кг массы тела могут быть необходимыми для достижения адекватных уровней в плазме. Надо дополнительно отметить, что для каждого конкретного субъекта конкретный режим дозировки надо оценивать и регулировать с течением времени в соответствии с индивидуальной потребностью и профессиональным суждением персоны, которая осуществляет или контролирует введение способствующего(их) проницаемости пептида(ов) и другого(их) биологически активного(ых) агента(ов). Интраназальная доза РУУ должна быть в диапазоне от 50 до 1600 мкг РУУ, предпочтительно от 75 до 800 мкг, более предпочтительно от 100 до 400 мкг, причем наиболее предпочтительная доза находится между 100 и 200 мкг, причем 150 мкг является дозой, которую считают весьма эффективной. Повторные интраназальные введения препарата по этому изобретению при режиме в диапазоне от около 0,1 до 24 ч между дозами, предпочтительно от 0,1 до 2,0 ч между дозами, должны поддерживать нормализованные постоянные терапевтические уровни пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, для максимизации клинической пользы и, при этом, минимизации рисков избыточного воздействия и побочных эффектов. Эту дозу можно вводить несколько раз в день, предпочтительно за полчаса до еды или когда наступает голод, чтобы способствовать сытости.

При самостоятельном введении пациентом себе свободно продаваемой лекарственной формы лечащий врач или пациент может варьировать дозировку Y2-агонистов, таких как РУУ, для поддержания желаемой концентрации в целевом месте.

В альтернативном варианте осуществления это изобретение предлагает композиции и способы для интраназальной доставки пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, причем соединение(я), представляющее(ие) собой пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, повторно вводят в соответствии с режимом дозировки для интраназального введения, включающим в себя неоднократные введения пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, субъекту в соответствии с ежедневным или еженедельным режимом для поддержания терапевтически эффективного повышающегося и понижающегося пульсирующего уровня пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в течение продолжительного периода введения. Эти композиции и способы предоставляют соединение(я), представляющее(ие) собой пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, которое(ые) субъект вводит сам себе в интраназальном препарате от двух до шести раз в день для поддержания терапевтически эффективного повышающегося и понижающегося пульсирующего уровня пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, на протяжении длительного периода введения доз от 8 до 24 ч.

Наборы

Это изобретение также включает в себя наборы, упаковки и мультиконтейнерные единицы, содержащие вышеуказанные фармацевтические композиции, активные ингредиенты и(или) средства для их введения с целью применения для предотвращения и лечения заболеваний и других состояний у субъекта, представляющего собой млекопитающее. Вкратце, эти наборы включают в себя контейнер или препарат, который содержит один или несколько белков, аналогов и миметиков пептида, связывающегося с

Y2-рецепторами, и(или) других биологически активных агентов в комбинации с агентами, способствующими доставке через слизистые, которые здесь описываются, введенных в состав фармацевтического препарата для доставки через слизистые оболочки.

Интраназальные препараты по данному изобретению можно вводить при использовании любого аэрозольного флакона или шприца. Примером интраназального аэрозольного флакона является "Nasal Spray Pump w/ Safety Clip, Pfeiffer SAP # 60548", который доставляет дозу 0,1 мл за один раз и имеет длину трубки 36,05 мм. Его можно приобрести у Pfeiffer of America of Princeton, NJ. Интраназальные дозы пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, такого как PYY, могут быть в диапазоне от 0,1 до около 1500 мкг/кг. При введении в виде интраназального спрея предпочтительно, чтобы размер частиц спрея составил 10-100, предпочтительно 20-100 мкм.

Для способствования потере массы интраназальную дозу пептида PYY, связывающегося с Y2-рецепторами, вводят при дозе, достаточно высокой для способствования сытости, но достаточно низкой, чтобы не индуцировать любые нежелательные побочные эффекты, такие как тошнота. Предпочтительная интраназальная доза пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, такого как PYY(3-36), составляет около 3-10 мкг на кг массы пациента, наиболее предпочтительно около 6 мкг на кг массы пациента. В стандартной дозе пациент должен получить от 50 до 800 мкг, более предпочтительно от 100 до 400 мкг, наиболее предпочтительно от 150 до 200 мкг. Пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, такой как PYY(3-36), предпочтительно вводят в срок по меньшей мере от десяти минут до одного часа до еды для предотвращения тошноты, но не более чем от двенадцати до двадцати четырех часов до еды. Пациенту вводят дозу по меньшей мере один раз в день, предпочтительно перед каждым приемом пищи, пока пациент не потеряет желаемое количество веса. Пациент затем получает поддерживающие дозы по меньшей мере один раз в неделю, предпочтительно ежедневно, для поддержания потери веса.

Как показывают данные из нижеследующих примеров, при введении через нос людям при использовании препарата пептида, связывающегося Y2-рецепторами, по данному изобретению, обнаружено, что PYY(3-36) снижает аппетит. Эти примеры также показывают, что впервые послепищевые физиологические уровни пептида PYY можно достигать интраназальным путем введения при использовании препаратов пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, по данному изобретению, причем пептидом, связывающимся с Y2-рецепторами, был PYY(3-36).

Нижеследующие примеры приведены для иллюстрации, но не для ограничения.

Пример 1.

Пример препарата для улучшенной доставки пептида YY через слизистые носа в соответствии с указаниями данного описания готовили и оценивали нижеследующим образом.

Таблица 1. Композиция препарата пептида YY

Препараты	Пептид YY ₃₋₃₆ в 100 мл пробы	Агент, способствующий доставке через слизистые
А	60 мкг	Забуференный фосфатами физраствор (0,8%) pH 7,4 (Контроль 1)
В	60 мкг	Забуференный фосфатами физраствор (0,8%) pH 5,0 (Контроль 2)
С	60 мкг	L-Аргинин (10% масса/объем)

D	60 мкг	Поли-L-аргинин (0,5% масса/объем)
E	60 мкг	Гамма-циклодекстрин (1% масса/объем)
F	60 мкг	α -Циклодекстрин (5% масса/объем)
G	60 мкг	Метил- β -циклодекстрин (3% масса/объем)
H	60 мкг	n-Каприновой кислоты натриевая соль (0,075% масса/объем)
I	60 мкг	Хитозан (0,5% масса/объем)
J	60 мкг	L- α -фосфатидилхолиндидеканоил (3,5% масса/объем)
K	60 мкг	S-Нитрозо-N-ацетилпеницилламин (0,5% масса/объем)
L	60 мкг	Пальмитоил-DL-карнитин (0,02% масса/объем)
M	60 мкг	Pluronic-127 (0,3% масса/объем)
N	60 мкг	Натрия нитропруссид (0,3% масса/объем)
O	60 мкг	Натрия гликохолат (1% масса/объем)
P	60 мкг	F1: Желатин, DDPC, МВЦД, ЭДТА
F1		L- α -фосфатидилхолиндидеканоил (0,5% масса/объем) Метил- β -циклодекстрин (3% масса/объем) ЭДТА (0,1% масса/объем, Inf. Conc. 0,5 M) Желатин (0,5 % масса/объем)

Пример 2.

Доставка через слизистые носа - кинетика проникновения и цитотоксичность

1. Органотипическая модель

Нижеследующие способы обычно применяют для оценки параметров, кинетики и побочных эффектов доставки через слизистые оболочки носовой полости для пептида YY в препаратах и способе по этому изобретению, а также для определения эффективности и характеристик различных агентов, способствующих интраназальной доставке, которые здесь раскрыты для комбинационного препарата или согласованного введения с пептидом YY.

Кинетика проникновения и цитотоксичность являются также полезными для определения эффективности и характеристик различных агентов, способствующих доставке через слизистые оболочки, раскрытых здесь для комбинационного препарата или согласованного введения с агентами, способствующими доставке через слизистые оболочки. В одном представляющем собой пример протоколе кинетика проникновения и отсутствие неприемлемой цитотоксичности продемонстрированы для агента, способствующего интраназальной доставке, описанного выше, в комбинации с биологически активным терапевтическим агентом, примером которого является пептид YY.

Система EpiAirway была разработана в MatTek Corp (Ashland, MA) в качестве модели псевдомногослойной эпителиальной выстилки респираторного тракта. Эпителиальные клетки выращивают на имеющих дно из пористой мембраны вкладышах для клеточной культуры на границе раздела воздух (жидкость), что приводит к дифференцировке клеток до сильно поляризованной морфологии. Апоикальная поверхность является реснитчатой с микроворсинчатой ультраструктурой, и этот эпителий продуцирует слизь (присутствие муцина было подтверждено иммуноблоттингом). Вкладыши имеют диаметр

0,875 см, что создает площадь поверхности, составляющую 0,6 см². Клетки высевают на вкладыши на производстве примерно за три недели до отгрузки. Один "набор" состоит из 24 единиц.

А. По доставке, эти единицы помещают на стерильные подложки в 6-луночные микропланшеты. В каждую лунку вносят по 5 мл патентованной культуральной среды. Эта основанная на DMEM среда является бессывороточной, но обогащена эпидермальным фактором роста и другими факторами. Эту среду всегда тестируют на эндогенные уровни любого цитокина или ростового фактора, который учитывают для интраназальной доставки, но она была свободной от всех цитокинов и факторов, исследованных к настоящему времени, за исключением инсулина. 5 мл объема являются как раз достаточными для обеспечения контакта с дном единиц на их подставках, но апикальной поверхности эпителия дают оставаться в прямом контакте с воздухом. Стерильные пинцеты используют на этой стадии и на всех последующих стадиях, включающих в себя перенос единиц в содержащие жидкость лунки для того, чтобы между донышками единиц и средой не был захвачен воздух.

Б. Единицы в планшетах поддерживают при 37°C в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ в воздухе в течение 24 ч. В конце этого периода времени среду заменяют свежей средой и возвращают единицы в инкубатор еще на 24 ч.

2. Экспериментальный протокол - кинетика проникновения

А. "Набор" из 24 единиц EpiAirway можно рутинно использовать для оценки пяти разных препаратов, каждый из которых вносят в четырех параллелях в лунки. Каждую лунку используют, чтобы определять кинетику проникновения (4 временные точки), трансэпителиальное сопротивление, митохондриальную редуктазную активность при измерении по восстановлению МТТ и цитолиз при измерении высвобождения ЛДГ. Дополнительную совокупность лунок используют как контроли, которые ложно обрабатывают во время определения кинетики проникновения, но в остальном с ними поступают так же, как с единицами, содержащими тестируемые пробы для определения трансэпителиального сопротивления, устойчивости и жизнеспособности. Определения на контролях также рутинно выполняют на единицах в четырех параллелях, но иногда мы использовали три параллели для контролей и отводили оставшиеся четыре единицы в наборе на измерение трансэпителиального сопротивления и жизнеспособности на необработанных единицах, или мы замораживали и оттаивали эти единицы для определений суммарных уровней ЛДГ, служивших стандартом 100%-ного цитолиза.

Б. Во всех экспериментах препарат для доставки через слизистые оболочки носовой полости, подлежащий изучению, наносят на апикальную поверхность каждой единицы в объеме 100 мкл, который является достаточным для покрытия всей апикальной поверхности. Надлежащий объем тестируемого препарата при концентрации, нанесенной на апикальную поверхность (обычно нужно не более чем 100 мкл), отставляют в сторону для последующего определения концентрации активного материала твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA) или другими назначенными анализами.

В. Единицы помещают без подставок в 6-луночные планшеты для эксперимента: каждая лунка содержит 0,9 мл среды, что является достаточным для контакта с пористой мембраной донышка единицы, но не создает любого значительного направленного вверх гидростатического давления на единицу.

Г. Для минимизации потенциальных источников ошибки и во избежание любого образования концентрационных градиентов единицы переносят из одной лунки, содержащей 0,9 мл, в другую для каждой временной точки в исследовании. Эти переносы делают в нижеследующих временных точках от нулевого времени, при котором 100 мкл тестируемого материала наносили на апикальную поверхность: 15, 30, 60 и 120 мин.

Д. Между временными точками держат единицы в планшетах в инкубаторе при 37°C. Планшеты, содержащие 0,9 мл среды в лунке, также поддерживают в инкубаторе так, что происходит минимальное изменение температуры во время коротких периодов, когда вынимают планшеты и переносят единицы из одной лунки в другую при использовании стерильного пинцета.

Е. По окончании каждой временной точки удаляют среду из лунки, из которой переносили каждую единицу, и берут аликвоты в две пробирки (в одну пробирку вносят 700 мкл, а в другие по 200 мкл) для определения концентрации проникшего тестируемого материала и, в случае, когда тестируемый материал является цитотоксическим, высвобождения цитозольного фермента, лактатдегидрогеназы, из эпителия. Эти пробы держат в холодильнике, если анализы надо проводить в течение 24 ч, или из проб берут аликвоты и держат замороженными при -80°C пока не оттаивают один раз для анализов. Повторных циклов замораживания-оттаивания следует избегать.

Ё. Для того, чтобы минимизировать ошибки, все пробирки, планшеты и лунки маркируют до начала эксперимента.

Ж. В конце 120-минутного интервала времени переносят единицы из последней из лунок, содержащих 0,9 мл, в 24-луночные микропланшеты, содержащие 0,3 мл среды на лунку. Этот объем снова является достаточным для контакта донышек единиц, но без оказания гидростатического давления на единицы. Единицы возвращают в инкубатор до измерения трансэпителиального сопротивления.

3. Экспериментальный протокол - трансэпителиальное сопротивление

А. Эпителиальные клетки респираторных путей образуют плотные стыки *in vivo*, а также *in vitro*, ограничивая ток растворенных веществ через них в ткань. Эти стыки придают трансэпителиальное со-

противление, составляющее несколько сотен $\text{Ом} \times \text{см}^2$, в отсеченных тканях дыхательных путей; в единицах MatTek EpiAirway трансэпителиальное сопротивление (TER) обычно составляет, как заявляют изготовители, около $1000 \text{ Ом} \times \text{см}^2$. Мы обнаружили, что TER контрольных единиц EpiAirway, подвергнутых ложной обработке в последовательности стадий исследования проникновения, является более низкой ($700\text{--}800 \text{ Ом} \times \text{см}^2$), но, поскольку проникновение малых молекул обратно пропорционально TER, эта величина является все равно достаточно высокой для создания главного барьера проникновению. Пористая мембрана доньшка единиц без клеток, напротив, создает только минимальное трансмембранное сопротивление ($5\text{--}20 \text{ Ом} \times \text{см}^2$).

Б. Для точного определения TER требуется помещать электроды омметра над значительной площадью поверхности выше и ниже мембраны и воспроизводимо контролировать дистанцию от электродов до мембраны. Способ определения TER, который рекомендует MatTek и используют для всех экспериментов здесь, использует эпителиальный вольтметр "EVOM"TM и камеру определения сопротивления тканей "ENDOHN"TM компании World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL.

В. Камеру сначала заполняют забуференным фосфатами физраствором Dulbecco, по меньшей мере, за 20 мин до определения TER для того, чтобы уравновесить электроды.

Г. Определения TER делают с 1,5 мл забуференного фосфатами физраствора в камере и с 350 мкл забуференного фосфатами физраствора в единице с мембранным доньшком, подлежащей измерению. Верхний электрод доводят до позиции чуть выше мембраны единицы, не содержащей клеток (но содержащей 350 мкл забуференного фосфатами физраствора), и затем фиксируют для обеспечения воспроизводимого позиционирования. Сопротивление не содержащей клеток единицы составляет в типичных случаях $5\text{--}20 \text{ Ом} \times \text{см}^2$ ("фоновое сопротивление").

Д. Как только камера приготовлена и фоновое сопротивление записано, единицы в 24-луночном планшете, который только что использовали в определениях проникновения, вынимают из инкубатора и индивидуально помещают в камеру для определений TER.

Е. Каждую единицу сначала переносят в чашку Петри, содержащую забуференный фосфатами физраствор для обеспечения полного смачивания мембраны доньшка. Добавляют к единице аликвоту, составляющую 350 мкл, забуференного фосфатами физраствора и затем тщательно отсасывают в маркированную пробирку для промывки апикальной поверхности. Затем единицу второй раз промывают забуференным фосфатами физраствором (350 мкл), который отсасывают в ту же пробирку для сбора.

Ё. Единицу осторожно промакивают от избытка забуференного фосфатами физраствора на ее внешней поверхности незадолго до помещения в камеру (содержащую свежую аликвоту 1,5 мл забуференного фосфатами физраствора). Аликвоту 350 мкл забуференного фосфатами физраствора добавляют к единице до помещения верхнего электрода на камеру и измерения TER на измерителе EVOM.

Ж. После считывания TER единицы в камере ENDOHN единицу вынимают, забуференный фосфатами физраствор отсасывают и сохраняют и единицу возвращают в соприкосновение с воздухом на апикальной поверхности в 24-луночный планшет, содержащий по 0,3 мл среды на лунку.

З. Проверяют единицы в нижеследующей последовательности: все ложнообработанные контроли, затем все обработанные препаратом пробы, затем второй промер TER каждого из ложнообработанных контролей. После завершения всех определений TER возвращают единицы в 24-луночный микропланшете в инкубатор для определения жизнеспособности по восстановлению МТТ.

4. Экспериментальный протокол - жизнеспособность по восстановлению МТТ

МТТ представляет собой проникающую в клетки тетразолиевую соль, которая восстанавливается митохондриальной дегидрогеназной активностью до нерастворимого окрашенного формазана жизнеспособными клетками с интактной митохондриальной функцией или немитохондриальной НАДФ(Н)-дегидрогеназной активностью клеток, способных к респираторному взрыву. Образование формазана является хорошим индикатором жизнеспособности эпителиальных клеток, поскольку эти клетки не способны к значительному респираторному взрыву. Мы использовали реагентный набор МТТ, приготовленный в MatTek Corp для их единиц с целью оценки их жизнеспособности.

А. Реагент МТТ поставляют в виде концентрата, и его разбавляют в патентованном разбавителе на основе DMEM в день анализа жизнеспособности (в типичных случаях пополудни в день утреннего определения кинетики проникновения и TER). Нерастворимый реагент удаляют кратковременным центрифугированием до использования. Конечная концентрация МТТ составляет 1 мг/мл.

Б. Готовый раствор МТТ добавляют к лункам 24-луночного микропланшета в объеме 300 мкл на лунку. Как было отмечено выше, этот объем является достаточным для контакта с мембранами единиц EpiAirway, но не оказывает значительного положительного гидростатического давления на клетки.

В. Единицы удаляют из 24-луночного планшета, в который их поместили после измерений TER, и после удаления любого избытка жидкости с внешней поверхности единиц их переносят на планшет, содержащий МТТ-реагент. Единицы в планшете затем помещают в инкубатор при 37°C в атмосферу 5% CO_2 в воздухе на 3 ч.

Г. В конце 3-часовой инкубации единицы, содержащие жизнеспособные клетки, становятся на вид пурпурными. Нерастворимый формазан следует экстрагировать из клеток в их единицах для количест-

венного определения степени восстановления МТТ. Экстракцию формазана осуществляют как прежде переносом единиц в 24-луночный микропланшет, содержащий по 2 мл экстрагирующего раствора в лунке, после удаления избытка жидкости с внешней поверхности единиц. Этот объем является достаточным для полного покрытия как мембраны, так и апикальной поверхности единиц. Экстракцию проводят в течение ночи при комнатной температуре в светонепроницаемой камере. Экстрагирующие растворы для МТТ традиционно содержат высокие концентрации детергента и разрушают клетки.

Д. В конце экстракции жидкость из каждой единицы и жидкость в окружающей ее лунке объединяют и переносят в пробирку для последующего отбора аликвот в 96-луночный микропланшет (аликвоты по 200 мкл являются оптимальными) и определения поглощения при 570 нм на спектрофотометре VMax для многолуночных микропланшетов. Для обеспечения того, что мутность от клеточных обломков из экстрагированных единиц не вносит вклад в это поглощение, на VMax также определяют поглощение при 650 нм для каждой лунки, которое автоматически вычитается из поглощения при 570 нм. Пустым контролем для определения поглощения формазана является 200-микролитровая аликвота экстрагирующего раствора, который не контактировал с единицами. Величину этого поглощения принимают за соответствующую нулевой жизнеспособности.

Е. Две единицы из каждого набора по 24 единицы EpiAirway оставляют необработанными во время определения кинетики проникновения и TER. Эти единицы используют в качестве положительных контролей на 100%-ную жизнеспособность клеток. Во всех исследованиях, которые мы проводили, не было статистически достоверной разницы между жизнеспособностью клеток в этих необработанных единицах при сравнении с клетками в контрольных единицах, которые были подвергнуты ложной обработке по кинетике проникновения и на которых осуществляли определения TER. Поглощение всех единиц, обработанных тестируемыми препаратами, принято считать линейно пропорциональным проценту жизнеспособности клеток в единицах во время инкубации с МТТ. Надо отметить, что этот анализ осуществляют в типичных случаях не раньше, чем через 4 ч после внесения тестируемого материала на апикальную поверхность и после промывки апикальной поверхности единиц во время определения TER.

5. Определение жизнеспособности по высвобождению ЛДГ

Хотя измерение активности митохондриальной редуктазы по восстановлению МТТ является чувствительным тестом на жизнеспособность клеток, этот анализ обязательно разрушает клетки, и поэтому его можно осуществлять только в конце каждого исследования. Когда клетки претерпевают некротический лизис, содержимое их цитозоля выливается в окружающую среду, и в этой среде можно детектировать цитозольные ферменты, такие как лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Анализ на ЛДГ в среде можно осуществлять в пробах среды, взятых на каждой временной точке двухчасового определения кинетики проникновения. Таким образом, можно детектировать цитотоксические эффекты препаратов, которые не развиваются, пока не пройдет значительное время, а также эффекты препаратов, которые индуцируют цитотоксичность с первых нескольких минут экспозиции ткани слизистого эпителия.

А. Рекомендованный анализ ЛДГ для оценки цитолиза в единицах EpiAirway основан на превращении лактата в пируват с образованием НАДН из НАД. НАДН снова окисляется с одновременным восстановлением тетразолиевого соли INT, катализируемом неочищенным препаратом "диафоразы". Формазан, образованный при восстановлении INT, является растворимым, так что весь анализ активности ЛДГ можно осуществлять в гомогенной водной среде, содержащей лактат, НАД, диафору и INT.

Б. Анализ активности ЛДГ осуществляют в 50-микролитровых аликвотах из проб "супернатанта" среды, окружающей единицу EpiAirway, и собранных в каждой временной точке. Эти пробы либо хранили не дольше чем 24 ч в холодильнике, либо оттаивали после замораживания в пределах нескольких часов после отбора. Каждая единица EpiAirway дает пробы супернатантной среды, собранные на сроке 15 мин, 30 мин, 1 ч и 2 ч после нанесения тестируемого материала. Все эти аликвоты переносят в 96-луночный микропланшет.

В. 50-микролитровая аликвота среды, которую не экспонировали единице, служит в качестве "пустого" или отрицательного контроля, соответствующего 0% цитотоксичности. Мы обнаружили, что кажущийся уровень "эндогенной" ЛДГ, присутствующей после взаимодействия смеси реагентов для анализа с неэкспонированной средой, является тем же в пределах экспериментальной ошибки, что и кажущийся уровень ЛДГ, высвобожденной всеми ложнообработанными контрольными единицами на протяжении всего времени, составляющего 2 ч, которое требуется для проведения исследований кинетики проникновения. Таким образом, в пределах экспериментальной ошибки, эти ложнообработанные единицы показывают отсутствие цитолиза эпителиальных клеток на протяжении времени измерений кинетики проникновения.

Г. Для получения пробы супернатантной среды, отражающей уровень ЛДГ, высвобожденной после лизиса 100% клеток в единице, единицу, которую не подвергали любым предварительным манипуляциям, помещают в лунку 6-луночного микропланшета, содержащего 0,9 мл среды, как в протоколе для определения кинетики проникновения, планшет, содержащий единицу, замораживают при -80°C, и содержимому лунки затем дают оттаять. Этот цикл замораживания-оттаивания эффективно лизирует клетки и высвобождает их цитозольное содержимое, включающее в себя ЛДГ, в супернатантную среду. Пятидесяти-микролитровую аликвоту среды из замороженных и оттаявших клеток вносят в 96-луночный планшет в качестве положительного контроля, отражающего 100%-ную цитотоксичность.

Д. К каждой лунке, содержащей аликвоту супернатантной среды, добавляют 50-микролитровую аликвоту реагента для анализа ЛДГ. Планшет затем инкубируют 30 мин в темноте.

Е. Взаимодействия прекращают добавлением стоп-раствора 1 М уксусной кислоты и в пределах одного часа после добавления стоп-раствора определяют поглощение в планшете при 490 нм.

Ё. Вычисление процента цитолиза основано на допущении линейной зависимости между поглощением и цитолизом, причем поглощение, полученное со средой в отдельности, служит в качестве стандарта для 0% цитолиза, и поглощение, полученное со средой, окружающей замороженные и оттаявшие единицы, служат в качестве стандарта 100% цитолиза.

6. Определения методом ELISA

Процедуры для определения концентраций биологически активных агентов в качестве тестируемых материалов для оценки способствования проникающей способности активных агентов в сочетании с согласованным введением агентов, способствующих доставке через слизистые оболочки, или комбинационного препарата по этому изобретению являются обычно такими, как описано выше, и соответствующими известным способам и конкретным инструкциям изготовителей наборов для ELISA, использованных для каждого конкретного анализа. Кинетику проникновения биологически активного агента обычно определяют проведением измерений в нескольких временных точках (например 15, 30, 60 и 120 мин) после контакта биологически активного агента с апикальной поверхностью эпителиальных клеток (который может быть одновременным с или следующим за экспозицией поверхности апикальных клеток агента(ам), способствующему(ам) доставке через слизистые оболочки.

Процедуры для определения концентраций пептида YY, нейропептида Y и панкреатического пептида в сыворотке крови, тканях или жидкостях центральной нервной системы (ЦНС), цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) или других тканях или жидкостях субъекта, представляющего собой млекопитающее, можно определять иммунологическим анализом на пептид YY, нейропептид Y и панкреатический пептид. Процедуры определения концентраций пептида YY, нейропептида Y и панкреатического пептида как материалов, тестируемых для оценки способствования проникающей способности активных агентов в сочетании с согласованным введением агентов, способствующих доставке через слизистые оболочки, или комбинационным препаратом по этому изобретению, являются обычно такими, как описано выше, и соответствующими известным способам и конкретным инструкциям изготовителя для радиоиммунного анализа (РИА), иммуноферментного анализа (ИФА) и антительных реагентов для иммуногистохимии или иммунофлуоресценции на пептид YY, нейропептид Y и панкреатический пептид. Bachem AG (King of Prussia, PA).

Тканевые мембраны EpiAirwayTM культивируют в не содержащей фенол красный и гидрокортизон среде (MatTek Corp., Ashland, MA). Тканевые мембраны культивируют при 37°C в течение 48 ч, чтобы дать ткани достичь равновесия. Каждую тканевую мембрану помещают в индивидуальную лунку 6-луночного планшета, содержащую 0,9 мл бессывороточной среды. 100 мкл препарата (тестируемая проба или контроль) наносят на апикальную поверхность мембраны. В каждом анализе оценивают три или четыре параллельные пробы каждой тестируемой пробы (агент, способствующий доставке через слизистые оболочки, в комбинации с биологически активным агентом-пептидом YY) и контроль (биологически активный агент-пептид YY в отдельности). В каждой временной точке (15, 30, 60 и 120 мин) тканевые мембраны перемещают в новые лунки, содержащие свежую среду. Пробы, находящиеся под 0,9 мл среды, собирают в каждой временной точке и хранят при 4°C для применения в ELISA и в анализах на лактатдегидрогеназу (ЛДГ).

Наборы для ELISA представляют собой в типичных случаях двухстадийные сэндвичные ELISA: иммунореактивная форма агента, подлежащего исследованию, сначала "захватывается" антителом, иммобилизованным на 96-луночном микропланшете, а после отмывки несвязанного материала из лунок проводят взаимодействие "детектирующего" антитела со связанным иммунореактивным агентом. Это детектирующее антитело является в типичных случаях конъюгированным с ферментом (наиболее часто с пероксидазой хрена), и количество фермента, связанного с планшетом в иммунных комплексах, затем измеряют анализом его активности с хромогенным реагентом. Вдобавок к пробам супернатантной среды, собранным в каждой из временных точек в исследованиях кинетики проникновения, надлежащим образом разбавленные пробы препарата (то есть, содержащие исследуемый биологически активный тестируемый агент), которые были нанесены на апикальную поверхность единиц в начале исследования кинетики, также анализируют в планшете для ELISA, наряду с совокупностью стандартов, поставляемых изготовителем. Каждую пробу супернатантной среды обычно анализируют в ELISA в двух параллельных лунках (надо вспомнить, что четыре параллели каждой единицы используют для определения кинетики проникновения каждого препарата, что в сумме дает шестнадцать проб супернатантной среды, собранных во всех четырех временных точках).

А. Не является необычным то, что после завершения ELISA кажущиеся концентрации активного тестируемого агента в пробах супернатантной среды или в разбавленных пробах материала, нанесенного на апикальную поверхность единиц, лежат вне диапазона концентраций стандартов. Никакие концентрации материала, присутствующего в экспериментальных пробах, не определяют экстраполяции за пределы концентрации стандартов; вместо этого пробы снова разбавляют надлежащим образом для получения

концентраций тестируемого материала, которые можно более аккуратно определять интерполяцией между стандартами при повторном ELISA.

Б. ELISA для биологически активного тестируемого агента, например пептида YY, является уникальным по его схеме и рекомендуемому протоколу. В отличие от большинства наборов ELISA использует два моноклональных антитела, одно для захвата, а другое, направленное на неперекрывающийся детерминант биологически активного тестируемого агента, например пептида YY, в качестве детектирующего антитела (это антитело является конъюгированным с пероксидазой хрена). Поскольку в экспериментальных пробах присутствуют концентрации пептида YY, которые лежат ниже верхнего предела анализа, можно использовать протокол анализа как в инструкциях изготовителя, который позволяют инкубировать пробы на планшете для ELISA с обоими антителами, присутствующими одновременно. Когда уровни пептида YY в пробе являются значительно более высокими, чем этот верхний предел, уровни иммунореактивного пептида YY могут превзойти количества антител в инкубационной смеси, и некоторая доля пептида YY, которая не была связана детектирующим антителом, должна быть захвачена на планшете, в то время как некоторая доля пептида YY, которая была связана детектирующим антителом, может не быть захваченной. Это ведет к серьезной недооценке уровней пептида YY в пробе (должно оказаться, что уровни пептида YY в такой пробе лежат значительно ниже верхнего предела анализа). Для того чтобы исключить эту возможность, протокол анализа был модифицирован.

Б.1. Разбавленные пробы сначала инкубируют на планшете для ELISA, содержащем иммобилизованное захватывающее антитело, в течение 1 ч в отсутствие любого детектирующего антитела. После 1 ч инкубации отмывают лунки от несвязанного материала.

Б.2. Детектирующее антитело инкубируют с планшетом в течение 1 ч, чтобы сделать возможным образование иммунных комплексов со всем захваченным антигеном. Концентрации детектирующего антитела являются достаточными для взаимодействия с максимальным уровнем пептида YY, который был связан захватывающим антителом. Планшет затем промывают снова для удаления любых несвязанных детектирующих антител.

Б.3. Субстрат пероксидазы добавляют к планшету и инкубируют в течение 15 мин, чтобы дать развиться окраске.

Б.4. Добавляют к планшету стоп-раствор и считывают поглощение при 450 нм, а также при 490 нм в спектрофотометре VMax для микропланшетов. Поглощение окрашенного продукта при 490 нм является гораздо более низким, чем при 450 нм, но поглощение при каждой длине волны все равно является пропорциональным концентрации продукта. Два снятия показаний прибора обеспечивают то, что поглощение является линейно соотносящимся с количеством связанного пептида YY на всем рабочем диапазоне прибора VMax (мы обычно ограничиваем этот диапазон величинами от 0 до 2,5 единиц оптической плотности (ЕОП), хотя о приборе заявлено, что он является точным в диапазоне от 0 до 3,0 ЕОП). Количество пептида YY в пробах определяют интерполяцией между значениями ОП, полученными для разных стандартов, включенных в ELISA. Пробы с величинами ОП вне диапазона, полученного для стандартов, разбавляют снова и промеряют в повторном ELISA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Измерение трансэпителиального сопротивления анализом TER

После последнего анализа по временным точкам помещали мембраны в индивидуальные лунки 24-луночного культурального планшета в 0,3 мл чистой среды и измеряли трансэпителиальное электрическое сопротивление (TER) при использовании эпителиального вольт-омметра EVOM и камеры Endohm (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Верхний электрод доводили до близости, но без контакта к верхней поверхности мембраны. Ткани удаляли по одной из их соответствующих лунок и базальные поверхности ополаскивали погружением в чистый забуференный фосфатами физраствор. Апикальные поверхности дважды осторожно ополаскивали забуференным фосфатами физраствором. Единицу ткани помещали в камеру Endohm, 250 мкл забуференного фосфатами физраствора добавляли к вкладышу, устанавливали верхний электрод и измеряли и записывали сопротивление. После измерения забуференный фосфатами физраствор сливали и вкладыш с тканью возвращали в культуральный планшет. Все значения TER представлены в качестве функции площади поверхности ткани.

Окончательные результаты вычисляли следующим образом:

$$\text{TER клеточных мембран} = (\text{Сопротивление (R) вкладыша с мембранами} - \text{R пустого вкладыша}) \times \text{площадь мембраны (0,6 см}^2\text{)}.$$

Эффект фармацевтических препаратов, содержащих пептид YY, и агентов, способствующих интраназальной доставке, на результаты измерений TER через мембраны клеток EpiAirway™ (слой клеток слизистого эпителия) показан на фиг. 1. Уменьшение величин TER относительно контрольных величин (контроль = приблизительно 1000 Ом·см²; нормализовано до 100) указывает на уменьшение сопротивления клеточных мембран и увеличение проницаемости клеток слизистого эпителия.

Пример препарата пептида YY, Препарат Р, показал наибольшее снижение сопротивления клеточных мембран (табл. 2). Эти результаты показывают, что пример препарата (например, Препарат Р) снижает сопротивление мембраны до менее 1% от контроля при тестируемых концентрациях. Показанные

величины являются средними по трем параллелям для каждого препарата. Препараты А и В представляют собой контроли, приготовленные восстановлением пептида YY (Bachem AG, King of Prussia, PA) и содержащие 60 мкг пептида Y₃₋₃₆ в 100 мл забуференного фосфатами физраствора при pH 7,4 или 5,0. Пептид YY без средств, способствующих доставке через слизистые оболочки, не снижает сопротивления.

Эти результаты показывают, что пример препарата для усовершенствованной интраназальной доставки пептида YY (например, Препарат Р) снижает сопротивление клеточных мембран и значительно увеличивает доставку через клетки слизистого эпителия. Примеры препарата должны усиливать интраназальную доставку пептида YY в сыворотку крови, или в ткань, или жидкость центральной нервной системы. Эти результаты показывают, что эти примеры препаратов при контакте со слизистым эпителием дают значительные увеличения проницаемости клеток слизистого эпителия для пептида YY.

Таблица 2. Влияние фармацевтических препаратов, содержащих пептид YY и агенты, способствующие интраназальной доставке, на трансэпителиальное сопротивление (TER) клеточных мембран EpiAirway

Препарат	Агент, способствующий доставке через слизистые оболочки	% TER
A	Забуференный фосфатами физраствор pH 7,4 (Контроль 1)	100
B	Забуференный фосфатами физраствор pH 5,0 (Контроль 2)	100
C	L-Аргинин (10% масса/объем)	47,88
D	Поли-L-аргинин (0,5% масса/объем)	3,96
E	Гамма-циклодекстрин (1% масса/объем)	91,67
F	Альфа-циклодекстрин (5% масса/объем)	88,91
G	Метил-β-циклодекстрин (3% масса/объем)	97,51
H	n-Каприновой кислоты натриевая соль (0,075% масса/объем)	47,72
I	Хитозан (0,5% масса/объем)	4,77
J	L-α-фосфатидилхолиндидеканоил (3,5% масса/объем)	0,49
K	S-Нитрозо-N-ацетилпеницилламин (0,5% масса/объем)	44,35
L	Пальмитоил-DL-карнитин (0,02% масса/объем)	1,76
M	Pluronic-127 (0,3% масса/объем)	97,57
N	Натрия нитропруссид (0,3% масса/объем)	92,41
O	Натрия гликохолат (1% масса/объем)	14,25
P	F1: Желатин, DDPC, МВЦД, ЭДТА	0,65

Кинетика проникновения при измерении анализом ELISA

Эффект фармацевтических препаратов по данному изобретению, содержащих пептид YY и агенты, способствующие интраназальной доставке, на проникновение пептида YY через клеточные мембраны

EpiAirway™ (слой клеток слизистого эпителия) измеряют как описано выше. Результаты показаны в табл. 3. Проницающую способность пептида YY через клеточные мембраны EpiAirway™ измеряют анализом ELISA.

У примеров интраназальных препаратов (например, Препарат Р) по данному изобретению наибольшее увеличение проникновения пептида YY происходило с Препаратом Р, как показано в табл. 3. Эта процедура использует анализ ELISA для определения концентрации биологически активного пептида YY, который проникал через эпителиальные клетки в окружающую среду на протяжении ряда временных точек. Эти результаты показывают увеличение проникновения пептида YY в Препарате Р при сравнении с Препаратом А или В (пептид YY, контрольный препарат; 60 мкг пептида YY₃₋₃₆ в 100 мл забуференного фосфатами физраствора при pH 7,4 или 5,0; Bachem AG, King of Prussia, PA). В среднем кумулятивное увеличение проникновения на сроке 120 мин при использовании примера интраназального препарата, представляющего собой Препарат Р, в 1195 раз больше по сравнению с контрольными Препаратами А или В.

Таблица 3. Влияние фармацевтических препаратов, содержащих пептид YY и агенты, способствующие интраназальной доставке, на проникновение пептида YY через клеточные мембраны EpiAirway по результатам анализа ELISA.

	Препарат Пептид YY ₃₋₃₆ (60 мкг/100 мл)	% проникновения по достижении временных точек (мин.)					Суммарный % проникновения	Разы увеличения проникновения
		0	15	30	60	120		
A	забуференный фосфатами физраствор pH 7,4 (Контроль 1)	0	0,00171	0,00096	0,00451	0,00327	0,01	1
B	забуференный фосфатами физраствор pH 5,0 (Контроль 2)	0	0,00093	0,00048	0,00042	0,00367	0,01	1
C	L-Аргинин (10% масса/объем)	0	0,00119	0,00277	0,00685	0,00566	0,02	2
D	Поли-L-аргинин (0,5% масса/объем)	0	0,00324	0,01587	0,10395	0,49656	0,62	62
E	Гамма-циклодекстрин (1% масса/объем)	0	0,00017	0,00042	0,00028	0,0035	0	1
F	α-Циклодекстрин (5% масса/объем)	0	0,00031	0,000745	0,00147	0,0031	0,01	1
G	Метил-β-циклодекстрин (3% масса/объем)	0	0,00028	0,00038	0,00059	0,01028	0,01	1
H	n-Каприновой кислоты натриевая соль (0,075% масса/объем)	0	0,0004	0,00131	0,00448	0,00821	0,01	1
I	Хитозан (0,5% масса/объем)	0	0,00086	0,01098	0,09749	0,82126	0,93	93
J	L-α-фосфатидилхолиндеканол (3,5% масса/объем)	0	0,00934	0,02	0,08507	1,9642	2,08	208
K	S-Нитрозо-N-ацетилпенициллин (0,5% масса/объем)	0	0,00074	0,0032	0,0688	0,90432	0,98	98
L	Пальмитоил-DL-карнитин (0,02% масса/объем)	0	0,00378	0,03422	0,15141	1,31011	1,5	150
M	Pluronic-127 (0,3% масса/объем)	0	0,00025	0,00027	0,00066	0,00395	0,01	1
N	Натрия нитропруссид (0,3% масса/объем)	0	0,00171	0,00114	0,00079	0,05492	0,05	5
O	Натрия гликохолат (1% масса/объем)	0	0,00325	0,00313	0,09023	0,70214	0,8	80
P	F1 Желатин, DDPG, МВЦД, ЭДТА	0	0,05864	1,3972	2,9799	7,519	11,95	1195

Анализ МТТ

Анализы МТТ осуществляли при использовании МТТ-100, наборов от MatTek. 300 мл раствора МТТ добавляли в каждую лунку. Вкладыши с тканью осторожно ополаскивали чистым забуференным

фосфатами физраствором и помешали в раствор МТТ. Пробы инкубировали при 37°C в течение 3 ч. После инкубации погружали вкладыши клеточной культуры в 2,0 мл экстрагирующего раствора в лунке для полного покрытия каждого вкладыша. Планшет для экстракции закрывали и герметизировали для снижения испарения. Экстракцию проводили в течение ночи при комнатной температуре в темноте. После завершения периода экстракции экстрагирующий раствор перемешивали и переносили пипеткой в 96-луночный микротитровальный планшет. Загружали по три параллели каждой пробы, а также пустые контроли экстрагирующего раствора. Оптическую плотность проб затем измеряли при 550 нм на устройстве считывания планшетов (Molecular Devices).

Анализ МТТ на примерах препарата для усовершенствованной доставки, осуществляемой через слизистые оболочки носовой полости, пептида YY в соответствии с указаниями этого описания (например, на Препарате Р) в сравнении с контрольными препаратами (Препараты А или В) показан в табл. 4. Эти результаты для препаратов, содержащих пептид YY и один или более чем один из агентов, способствующих интраназальной доставке, например для Препарата Р (эксперимент осуществляли в трех параллелях), показывают, что этот препарат, представляющий собой примерный вариант осуществления изобретения, оказывает минимальный токсический эффект на жизнеспособность тканей слизистого эпителия.

Таблица 4. Влияние фармацевтических препаратов, содержащих пептид YY и агенты, способствующие интраназальной доставке, на жизнеспособность клеточных мембран EpiAirway, как показывает % МТТ

Препараты	Обработка	% МТТ
A	Забуференный фосфатами физраствор pH,4 (Контроль 1)	100
B	Забуференный фосфатами физраствор pH 5,0 (Контроль 2)	100
C	L-Аргинин (10% масса/объем)	91,54
D	Поли-L-аргинин (0,5% масса/объем)	79,39
E	Гамма-циклодекстрин (1% масса/объем)	100
F	α -Циклодекстрин (5% масса/объем)	96,63
G	Метил- β -циклодекстрин (3% масса/объем)	100
H	n-Каприновой кислоты натриевая соль (0,075% масса/объем)	100
I	Хитозан (0,5% масса/объем)	100
J	L- α -фосфатидилхолиндидеканоил (3,5% масса/объем)	94,25
K	S-Нитрозо-N-ацетилпсцилламин (0,5% масса/объем)	97,64
L	Пальмитоил-DL-карнитин (0,02% масса/объем)	91,77
M	Pluronic-127 (0,3% масса/объем)	100
N	Натрия нитропруссид	100
	(0,3% масса/объем)	
O	Натрия гликохолат (1% масса/объем)	100
P	F1: Желатин, DDPC, MBЦД, ЭДТА	88,75

Анализ ЛДГ

Анализ ЛДГ на примерах препарата для усовершенствованной доставки, осуществляемой через слизистые оболочки носовой полости, пептида YY в соответствии с указаниями этого описания (например, на Препарате Р) показан в табл. 5. Результаты для трех параллелей Препарата Р показывают, что этот препарат, представляющий собой примерный вариант осуществления изобретения, оказывает минимальный токсический эффект на жизнеспособность слизистой эпителиальной ткани.

Таблица 5. Влияние фармацевтических препаратов, содержащих пептид YY и агенты, способствующие интраназальной доставке, на жизнеспособность клеточных мембран EpiAirway, как показывает % мертвых клеток (анализ ЛДГ)

Препараты	Обработка	% мертвых клеток
A	Забуференный фосфатами физраствор, pH,4 (Контроль 1)	1,0
B	Забуференный фосфатами физраствор, pH 5,0 (Контроль 2)	1,1
C	L-Аргинин (10% масса/объем)	0,8
D	Поли-L-аргинин (0,5% масса/объем)	1,4
E	Гамма-циклодекстрин (1% масса/объем)	0,8
F	α -Циклодекстрин (5% масса/объем)	0,7
G	Метил- β -циклодекстрин (3% масса/объем)	0,8
H	n-Каприновой кислоты натриевая соль (0,075% масса/объем)	1,3
I	Хитозан (0,5% масса/объем)	0,7
J	L- α -фосфатидилхолиндидеканоил (3,5% масса/объем)	1,2
K	S-Нитрозо-N-ацетилпеницилламин (0,5% масса/объем)	0,7
L	Пальмитоил-DL-карнитин (0,02% масса/объем)	0,8
M	Pluronic-127 (0,3% масса/объем)	1,0
N	Натрия нитропруссид (0,3% масса/объем)	0,6
O	Натрия гликохолат (1% масса/объем)	0,8
P	F1: Желатин, DDPG, МВЦД, ЭДТА	2,0

Пример 3.

Препарат Р (Пептид YY) по данному изобретению в комбинации с кортикоидом триамцилонацетонидом улучшает жизнеспособность клеток.

Данный пример показывает исследование *in vitro* для определения проницаемости и снижения воспаления слизистого эпителия для интраназально вводимого пептида YY, например человеческого пептида YY, в комбинации с композицией стероида, например триамцилонацетонида, и дополнительно в комбинации с одним или более из агентов, способствующих интраназальной доставке. Это исследование включает в себя определение проницаемости эпителиальных клеток в анализе TER и снижение воспаления слизистого эпителия при измерении жизнеспособности клеток в анализе МТТ при нанесении варианта осуществления изобретения, содержащего пептид YY и триамцилонацетонид.

Препарат Р (см. выше табл. 1) комбинируют в препарате с триамцилонацетонидом в дозе 0,5, 2,0, 5,0, или 50 мкг. Нормальная доза триамцилонацетонида (Nasacort®, Aventis Pharmaceuticals) для сезонного аллергического ринита составляет 55 мкг на спрей. Препарат Р в комбинации с кортикоидом триамцилонацетонидом улучшает жизнеспособность клеток при измерении в анализе МТТ, в то же время подерживая проницаемость эпителиальных клеток при измерении в анализах TER и ELISA.

В соответствии со способами и препаратами по этому изобретению измерение проникающей способности в случае Препарата Р в присутствии или в отсутствие триамцилонацетонида осуществляют анализами трансэпителиального электрического сопротивления (TER) в клеточных мембранах EpiAirway™. Анализы TER с Препаратом Р плюс триамцилонацетонидом при концентрации 0,5, 2,0, 5,0, или 50 мкг на спрей показывают, что проникающая способность пептида YY не была снижена и была равна проникающей способности в случае только Препарата Р. Проникающая способность в случае, представляющем собой Препарат Р плюс триамцилонацетонид при концентрации триамцилонацетонида между 0 и 50 мкг на спрей, является в типичных случаях по меньшей мере в 10-100 раз большей, чем в случае Препаратов А или В (контрольный пептид YY).

В соответствии со способами и препаратами по этому изобретению измерение проникающей способности в случае Препарата Р в присутствии или в отсутствие триамцилонацетонида осуществляют анализом ELISA на клеточных мембранах EpiAirway™. Аналогично вышеописанному анализу TER анализ ELISA в случае, представляющем собой Препарат Р плюс триамцилонацетонид при концентрации 0,5, 2,0, 5,0 или 50 мкг на спрей, показывает, что проникающая способность пептида YY не была снижена и была равна проникающей способности в случае Препарата Р в отдельности. Проникающая способность в случае, представляющем собой Препарат Р плюс триамцилонацетонид при концентрации триамцилонацетонида между 0 и 50 мкг на спрей, является в типичных случаях большей, чем в случае Препаратов А или В (контрольный пептид YY).

В соответствии со способами и препаратами по этому изобретению анализ МТТ измеряет жизнеспособность клеток в случае Препарата Р в присутствии или в отсутствие триамцилонацетонида. В типичных случаях добавление триамцилонацетонида (при концентрации 0,5, 2,0, 5,0 или 50 мкг на спрей) к Препарату Р улучшает жизнеспособность клеток при сравнении с Препаратом Р в отсутствие триамцилонацетонида.

Добавление триамцилонацетонида к Препарату Р увеличивает жизнеспособность клеток и поддерживает эпителиальную проницаемость при измерении в анализе TER по сравнению с Препаратом Р в отсутствие триамцилонацетонида.

Снижение воспаления слизистого эпителия вводимым интраназально пептидом YY осуществляют интраназальным препаратом пептида YY в комбинации с одним или несколькими соединениями, представляющими собой стероид или кортикоид, в типичных случаях, соединений или препаратов, имеющих высокую действенность, но также, в определенных случаях, соединений или препаратов, имеющих среднюю действенность или низкую действенность. Указана суммарная действенность (эквивалентные дозировки) стероидов с высокой, средней и низкой действенностью. В типичных случаях интраназальный препарат пептида YY в комбинации с композицией стероида, имеющего высокую действенность, включает в себя, но не ограничивается, бетаметазоном (от 0,6 до 0,75 мг в дозе) или дексаметазоном (0,75 мг в дозе). В альтернативном препарате интраназальный препарат пептида YY в комбинации с композицией стероида, имеющего среднюю действенность, включает в себя, но не ограничивается, метилпреднизолоном (4 мг в дозе), триамцинолоном (4 мг в дозе) или преднизолоном (5 мг в дозе). В дополнительном альтернативном препарате интраназальный препарат пептида YY в комбинации с композицией стероида, имеющего низкую действенность, включает в себя, но не ограничивается, гидрокортизоном (20 мг в дозе) или кортизоном (25 мг в дозе).

Пример 4. Получение препарата РYY, свободного от стабилизатора, которым является белок.

Препарат РYY, подходящий для интраназального введения РYY, по существу свободный от стабилизатора, которым является белок, готовили с помощью перечисленных ниже препаратов.

1. Около 3/4 воды добавляли в пробирку и перемешивали на магнитной мешалке, добавляли цитрат натрия до полного растворения.
2. Затем добавляли ЭДТА и перемешивали до полного растворения.
3. Затем добавляли лимонную кислоту и перемешивали до полного растворения.
4. Добавляли метил-β-циклодекстрин и перемешивали до полного растворения.
5. Затем добавляли DDPC и перемешивали до полного растворения.
6. Затем добавляли лактозу и перемешивали до полного растворения.
7. Затем добавляли сорбит и перемешивали до полного растворения.
8. Затем добавляли хлорбутанол и перемешивали до полного растворения.
9. Добавляли РYY 3-36 и осторожно перемешивали до его растворения.
10. Необходимо проверить pH, чтобы удостовериться в том, что его величина равна $5,0 \pm 0,25$. Добавляли разбавленную HCl или разбавленный NaOH для доведения pH.
11. Добавляли воду до получения конечного объема.

Таблица 6

Реагент	Марка	Поставщик	мг/мл	%
Хлорбутанол, безводный	NF	Spectrum	5,0	0,50
Метил-β-циклодекстрин		Sigma	45	4,5
L-α-Фосфатидилхолиндидеканоил		Sigma	1	0,1
Двухосновный эдетат натрия	USP	Dow Chemicals	1	0,1
Дигидрат цитрата натрия	USP	Spectrum	1,62	0,162
Лимонная кислота, безводная	USP	Sigma	0,86	0,086
α -Лактозы моногидрат		Sigma	9	0,9
Сорбит		Sigma	18,2	1,82
РYY 3-36	GMP	Bachem	1	0,1
Очищенная вода				

pH препарата 5 +/- 0,25

Осмолярность ~250

Пример 5.

Второй препарат готовили как указано выше, за исключением того, что концентрация РYY 3-36 составляла 15 мг/мл, как показано ниже в табл. 7.

Таблица 7

Реагент	Марка	Поставщик	мг/мл	%
Хлорбутанол, безводный	NF	Spectrum	5,0	0,50
Метил-β-циклодекстрин		Sigma	45	4,5
L-α-Фосфатидилхолиндидеканоил		Sigma	1	0,1
Двухосновный эдетат натрия	USP	Dow Chemicals	1	0,1
Дигидрат цитрата натрия	USP	Spectrum	1,62	0,162
Лимонная кислота, безводная	USP	Sigma	0,86	0,086
α-Лактозы моногидрат		Sigma	9	0,9
Сорбит		Sigma	18,2	1,82
РYY 3-36	GMP	Bachem	15	0,1
Очищенная вода				

pH препарата 5 +/- 0,25

Пример 6.

Определение оптимального pH РYY.

Определение стабильности РYY₃₋₃₆ в зависимости от pH при 40° С в течение 5 дней

А. Протокол составления проб РYY (3-36) для исследования стабильности в зависимости от pH

Осмолярность: целевая - 250 мМ

При использовании буфера цитрат/трехосновный цитрат натрия, 10 мМ

Осмолярность = число частиц × молярность = $(1+4) \times 10\text{мМ} = 50\text{мМ}$

Поэтому доводят осмолярность до 250 мМ использованием 100 мМ NaCl (2 частицы).

Б. Получение проб для исследования стабильности, как указано ниже (3500 мкл)

Конечная концентрация

Цитратный буфер	1400 мкл	25мМ (при требуемом конечном рН)	10 мМ
РYY	700 мкл	1,5 мг/мл	300 мкг/мл
Хлорбутанол	350 мкл	2,5%	0,25%
NaCl	350 мкл	1,0М	100 мМ

Проверяют рН и изменяют, если требуется.

Доводят объем Q.S. нужным количеством воды до 3500 мкл.

Процедура: 120-мкл проба в 200-мкл силанизированных вкладышах в аутосэмплерных флаконах 3 вытяжки на каждую временную точку. Пробы инкубировали при 40°C в течение 5 дней.

В. Сравнение целевой и фактической конечных величин рН смесей для определения стабильности

<u>Целевая величина рН</u>	<u>Фактическая величина рН</u>
3.0	2,99
3,5	3,47
4.0	3,90
4,5	4,42
5.0	4,90
7,0	7,38

Г. Процедура ВЭЖХ

Колонка:	Waters C18 Bondapak 10 мкм 4,6 × 300mm
Система ВЭЖХ :	Waters Alliance 2690
Детектор:	Waters 2487 Dual, длина волны 220 нм
Скорость тока:	1мл/мин
Объем ввода:	30мкл
Температура колонки.	30°C

Подвижные фазы:

Буфер А: 0,1% ТФУК, 1% ацетонитрил в воде

Буфер Б: 0,11% ТФУК в ацетонитриле

Градиент:

Время (минуты)	%А	%Б
0	75	25
17	42	58
19	75	25
28	75	25

Д. Результаты и выводы.

Результаты показывают, что в конкретных условиях, использованных в этом исследовании, оптимальная для стабильности величина рН составляет 4,90. Имеет место увеличение стабильности от 76 до 87% при увеличении рН от 2,99 до 4,90.

При более высоких рН, а именно при 7,38, имеет место сильное падение стабильности РYY₃₋₃₆, причем остается только 15% по отношению к нулевому моменту времени.

Пример 7. Разработка интраназального препарата.

Пептиды и белки являются относительно хрупкими молекулами по сравнению с низкомолекулярными терапевтическими средствами. Целью фазы разработки препарата была идентификация кандидатных препаратов, подходящих для интраназальной доставки. Для достижения этой цели многочисленные кандидаты были тестированы по доставке через слизистые оболочки носовой полости, по токсичности и

по эффективности консерванта для того, чтобы идентифицировать препарат с приемлемой стабильностью лекарственного средства.

Сначала проверяли эффект pH. Фиг. 1 показывает стабильность РУУ₃₋₃₆ при высокой температуре (40°C) при различных pH от 3,0 до 7,4. При физиологическом pH имела место существенная потеря лекарственного средства при повышенной температуре. Наилучшая стабильность была достигнута приблизительно при pH 5,0. Эта величина pH была выбрана для дополнительной оптимизации препарата.

Для того, чтобы дополнительно оптимизировать стабильность, тестировали различные стабилизирующие агенты на их способность облегчать прохождение лекарственного средства через слизистую оболочку носовой полости. Тестируемые агенты усиления были выбраны на основании их способности открывать плотные стыки при ограниченной токсичности для клеток. Для этого использовали модель, представляющую собой первичные эпителиальные клетки человека (EpiAirway, MatTek, Inc., Ashland MA). Эта клеточная линия формирует псевдомногослойный колончатый слой эпителиальных клеток с плотными стыками, аналогичный респираторному эпителию, находящемуся в носовой полости. Препараты лекарственного средства помещали на апикальную сторону слоя ткани и осуществляли количественное определение лекарственного средства для базальных сред. Степень открытия плотных стыков измеряли по трансэпителиальному электрическому сопротивлению (TEER). Жизнеспособность клеток и цитотоксичность отслеживали по анализам МТТ и ЛДГ, соответственно. Данные из репрезентативного скринингового эксперимента показаны на фиг. 2-5.

Фиг. 2 показывает данные для TEER. В некоторых случаях имело место небольшое или нулевое снижение TEER по сравнению с контролем, что указывает на то, что плотные стыки остаются закрытыми. В других случаях имело место существенное падение TEER, свидетельствующее об открытии плотных стыков. Эти результаты демонстрируют то, что эта клеточная модель *in vitro* в состоянии дискриминировать способность разных препаратов открывать плотные стыки.

С тестируемыми кандидатными препаратами жизнеспособность клеток (фиг. 3; МТТ) была хорошей, а цитотоксичность (фиг. 4; ЛДГ) была низкой.

В общем, протестировали свыше 200 разных препаратов, что отражает высокую пропускную способность этой модели для скрининга *in vitro*. При использовании всех доступных данных был проведен многофакторный анализ для выяснения эффекта каждого компонента препарата на каждую из 7 выходных переменных (проникающая способность лекарственного средства, осмоляльность, стабильность при замораживании и ускоренных условиях, TEER и анализы МТТ и ЛДГ). Многофакторный анализ состоял из первичного анализа каждого компонента препарата на некоторый уровень корреляции с выходными параметрами ($p < 0,1$). С идентифицированным подмножеством были использованы либо модель линейной регрессии, либо модель пошагового логистического отбора. Из результатов следует, что один наполнитель коррелировал с осмоляльностью и токсичностью ($r^2 = 0,91$ и $0,27$, соответственно), два коррелировали с проникающей способностью РУУ₃₋₃₆ ($r^2 = 0,44$), три влияли на стабильность ($r^2 = 0,24$) и пять влияли на параклеточное сопротивление ($r^2 = 0,55$). Наилучшие препараты, определенные этим способом, увеличивали транспорт РУУ₃₋₃₆ по меньшей мере в 30-75 раз по сравнению с простыми буферными растворами.

На основании этих анализов был выбран оптимизированный препарат РУУ₃₋₃₆ для дальнейшей разработки. Этот оптимизированный препарат содержал два стабилизатора, три агента, улучшающих проникающую способность, один хелатирующий агент и один консервант в натрийацетатном буфере, pH 5,0. Этот препарат прошел тестирование эффективности консерванта по Фармакопее США (USP). Синергические вклады различных компонентов в проникающую способность лекарственного средства представлены на фиг. 5. При сравнении с препаратами с простым буфером при той же осмоляльности оптимизированный препарат показывает более чем в 100 раз увеличенную проникающую способность лекарственного средства.

Наконец, приготавливали доклинические и клинические партии оптимизированного препарата и проверяли на стабильность при 5 и 25°C в упаковках готового продукта. Предварительные данные, показанные в табл. 8, выявляют в сущности нулевую потерю лекарственного средства за один месяц при 5 или 25°C.

Таблица 8

	5°C	25°C
Временная точка	% РУУ	% РУУ
0	100,0	100,0
3 дня	99,8	100,1
7 дней	102,6	98,4
10 дней	103,3	101,7
2 недели	101,4	97,9
3 недели	100,3	95,4
1 месяц	100,5	96,3
1,5 месяцев	100,1	
2 месяца	99,8	

В общем, наш способ разработки препарата дал препарат РУУ₃₋₃₆ с подходящей стабильностью лекарственного средства, доставкой через слизистую мембрану носовой полости, токсичностью и эффективностью консерванта, делающий возможной доставку пептида с молекулярной массой 4 кДа.

Доклинические исследования

К настоящему времени завершена серия из шести доклинических исследований на крысах, кроликах и собаках. Уровни РУУ₃₋₃₆ в плазме всех видов определяли апробированным патентованным способом радиоиммунного анализа.

Определено, что биологическая доступность (молярная доля лекарственного средства, идентифицированного в плазме, деленная на количество, введенное через нос) у крыс составляет приблизительно 6% и у кроликов составляет приблизительно 8%. Эти величины могут занижать истинную биологическую доступность, поскольку любая деградация пептида в плазме до взятия пробы или деградация после взятия пробы, несмотря на присутствие ингибитора белказ, должна снижать измеренную биологическую доступность.

Токсичность для носовой полости оценивали в моделях на крысах и кроликах в течение не более 14 последовательных дней при дозах в 50 раз выше ожидаемых клинических доз для человека при расчете в мг/кг. Не было найдено микроскопических или грубых патологических изменений, относящихся к тестируемому продукту. Клинические наблюдения отсутствуют.

Системную токсичность после внутривенного введения оценивали в моделях на крысах и кроликах. При IV дозах примерно в 160 раз более высоких, чем ожидается для доз для человека (400 мкг/кг у крыс и 205 мкг/кг у кроликов) не было микроскопических или грубых изменений, связанных с тестируемым продуктом.

Сердечно-сосудистую токсичность проверяли на модели с анестезированной собакой при схеме исследования диапазона доз. Самая высокая дозировка, инфузия РУУ₃₋₃₆, не превышающая 24 мкг/кг за 60 мин, соответствовала 33-кратной ожидаемой дозе для человека в расчете на площадь поверхности тела. Полученный уровень в плазме, 30 нг/мл, был приблизительно в 380 раз больше базального уровня в плазме собак. При этих уровнях в плазме не было эффекта на артериальное давление крови, бедренный ток крови или QTc, и были отмечены только незначительные изменения в биении сердца (увеличение в среднем от 123 до 148 ударов в минуту) и скорости дыхания (снижение от 54 до 36).

В этих доклинических исследованиях были собраны фармакокинетические данные. Уровни в плазме после интраназального введения при различных дозах из одного исследования на крысах показаны на фг. 6, 7 и 8. Фиг. 6 показывает, что РУУ₃₋₃₆ наблюдается в плазме в течение первых 5 мин, пиковая концентрация в плазме (T_{max}) достигается за 10-15 мин и период полужизни по окончательной элиминации

составляет приблизительно 15 мин. Как $C_{\max}$, так и AUC_{0-t} являются линейными относительно интраназальной дозы.

Клинические исследования

Было начато клиническое испытание диапазона дозировки с целью установления безопасности, фармакокинетики и биологической доступности интраназального препарата РУУ₃₋₃₆. К настоящему времени пациенты были включены в первые две из пяти дозовых когорт. Один пациент сообщил о вкусовом ощущении в задней части горла, других неблагоприятных эффектов к настоящему времени не было.

Вывод

Для интраназального препарата РУУ₃₋₃₆ начаты работы по составлению препарата и доклиническая и начальная клиническая работы. Подход к изучению состава препарата привел к более чем стократному увеличению трансмембранной проникающей способности этого пептида, имеющего молекулярную массу 4 кДа, без увеличения токсичности для клеток. Доклинические исследования продемонстрировали значительный порог безопасности по интраназальной, сердечно-сосудистой и системной токсичности РУУ₃₋₃₆. На основании текущего клинического исследования диапазона доз планируются исследования потери массы тела при регулярном введении.

Пример 8а.

КЛИНИЧЕСКИЙ ПРОТОКОЛ АБСОРБЦИЯ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩАЯСЯ ЧЕРЕЗ НОСОВУЮ ПОЛОСТЬ, ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ПЕПТИДА УУ₃₋₃₆ (РУУ₃₋₃₆) У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Цель настоящего исследования:

Цель настоящего исследования состояла в том, чтобы оценить абсорбцию вводимого интраназально РУУ₃₋₃₆ в кровотоки из носа. Это была фаза I клинического однократного исследования повышения дозы у нормальных, здоровых добровольцев мужского и женского пола, которые принимали участие на голодный желудок. Повышаемые дозы интраназального РУУ₃₋₃₆ оценивали в диапазоне от 20 до 200 мкг для оценки безопасности, переносимости в носовой полости и абсорбции РУУ₃₋₃₆. Кроме того, у каждого индивида делали оценку аппетита.

РУУ₃₋₃₆ был введен 15 здоровым людям, разделенным на 5 групп по 3 индивида в каждой.

Группа I

Первой группе РУУ₃₋₃₆ было введено в виде интраназального спрея по 20 мкг в 0,1 мл раствора.

Группа II

Члены второй группы получили интраназально по 50 мкг РУУ₃₋₃₆ в 0,1 мл раствора.

Группа III

Члены третьей группы получили интраназально по 100 мкг РУУ₃₋₃₆ в 0,1 мл раствора.

Группа IV

Члены четвертой группы получили интраназально по 150 мкг РУУ₃₋₃₆ в 0,1 мл раствора.

Группа V

Члены пятой группы получили интраназально по 200 мкг РУУ₃₋₃₆ в 0,1 мл раствора.

Была взята кровь на анализ и определена концентрация РУУ в плазме в момент 0 (то есть, до приятия дозы) и через 5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 мин после дозы. Субъектов затем кормили и брали у них анализ крови для определения концентрации РУУ через 30 мин после еды. Концентрацию РУУ₃₋₃₆ в плазме определяли путем использования апробированной аналитической процедуры.

Для каждого субъекта вычисляли нижеследующие параметры фармакокинетики, когда возможно, на основании концентрации РУУ₃₋₃₆ в плазме в соответствии с подходом, независимым от модели:

$C_{\max}$	Максимальная наблюдаемая концентрация.
$t_{\max}$	Время до максимальной концентрации.
AUC_{0-t}	Площадь под кривой зависимости концентрации от времени от момента 0 до момента последней измеримой концентрации, вычисляемая по линейному правилу трапеций.

Нижеследующие параметры вычисляли, когда данные позволяли аккуратную оценку этих параметров:

$AUC_{0-\infty}$	Область под кривой зависимости концентрации от времени, экстраполированной к бесконечности, вычисляли при использовании формулы:
------------------	--

C_t

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + \frac{C_t}{K_e}$$

 K_e

где C_t является последней измеримой концентрацией и K_e является кажущейся константой скорости конечной фазы.

K_e	Кажущаяся константа скорости конечной фазы, причем K_e представляет собой величину наклона линейной регрессии профиля $\log$ концентрации против времени во время конечной фазы.
$t_{1/2}$	Кажущийся период полужизни в конечной фазе (когда возможно), где $t_{1/2} = (\ln 2)/K_e$.

Вычисления фармакокинетики осуществлялись при использовании коммерческих программ, таких как WinNonlin (Pharsight Corporation, Версия 3,3 или более высокая). Результаты показаны ниже на графиках.

Обсуждение и вывод

Предпосылки

Каждая дозировочная группа включала в себя трех субъектов, которым один раз вводили интраназально дозу препарата этого изобретения, содержащего конкретную дозу синтетического, не содержащего пирогены человеческого РYУ₃₋₃₆. Были организованы пять дозировочных групп с увеличивающимися дозами препарата РYУ₃₋₃₆. Пробы крови собирались в определенные интервалы в пробирки для сбора крови, которые содержали литиевую соль гепарина (для ингибирования коагуляции) и аprotинин (для сохранения РYУ₃₋₃₆). Плазму из каждой пробы крови собирали центрифугированием и хранили в замороженных аликвотах. Одну замороженную аликвоту каждой пробы крови отправляли в Аналитические службы Natestch, куда они приходили замороженными. Каждую пробу хранили замороженной до анализа на концентрацию РYУ радиоиммунным анализом (РИА).

Наблюдения

Группа 1. В этой группе субъектам вводили дозу в 20 мкг РYУ₃₋₃₆. Концентрация РYУ в плазме у субъектов варьировала от минимальной "менее чем 20 пг/мл" (ниже нижнего предела количественного определения в радиоиммунном анализе) до максимальной 159 пг/мл. Наблюдаемые тенденции концентраций не соответствуют значительной абсорбции лекарственного средства в кровь исследованных субъектов.

Группа 2. В этой группе субъектам вводили дозу в 50 мкг РYУ₃₋₃₆. Концентрации РYУ в плазме у субъектов варьировали от минимальный 50 пг/мл до максимальной 255 пг/мл. Наблюдаемые тенденции концентрации соответствуют значительной абсорбции лекарственного средства в кровь исследуемых субъектов.

Группа 3. В этой группе субъектам вводили дозу 100 мкг РYУ₃₋₃₆. Концентрации РYУ в плазме у субъектов варьировали от минимальный 87 пг/мл до максимальной 785 пг/мл. Наблюдаемые тенденции концентраций соответствуют значительной абсорбции лекарственного средства в кровь исследованных субъектов.

Группа 4. В этой группе субъектам вводили дозу 150 микрограмм РYУ₃₋₃₆. Концентрации РYУ в плазме у субъектов варьировали от минимальный 45 пг/мл до максимальной 2022 пг/мл. Наблюдаемые тенденции концентрации соответствуют значительной абсорбции лекарственного средства в кровь исследуемых субъектов.

Группа 5. В этой группе субъектам вводили дозу 200 мкг РYУ₃₋₃₆. Концентрации РYУ в плазме у субъектов варьировали от минимальной 48 пг/мл до максимальной 1279 пг/мл. Наблюдаемые тенденции концентраций соответствуют значительной абсорбции лекарственного средства в кровь исследованных субъектов.

Эти результаты соответствуют дозозависимой абсорбции РYУ₃₋₃₆.

Дополнительные наблюдения и данные:

Краткое описание полученных результатов:

При интраназальной дозе от 50 до 200 мкг имеет место зависимое от дозы поглощение РYУ в плазму.

Длительность повышенной концентрации в плазме является значительно более долгой, чем можно предсказать, при расчетном периоде полувыведения, составляющем 55 мин.

$C_{\max}$ и AUC_{0-t} показывают хорошую линейность зависимости от дозы.

Имеется значительная вариабельность при данной дозе между субъектами.

К удивлению, это исследование не выявило повышения РУУ после еды, хотя количество съеденной пищи не измеряли, и, если было съедено слишком мало, то это может объяснить такие результаты наблюдений.

Ответы на вопросы по визуально-аналоговой шкале голода подразумевают некоторое снижение голода по мере увеличения доз РУУ.

Предполагается, что тошнота и головокружение связаны с очень высокой концентрацией УУ в плазме.

Величины, основанные на анализе, раскрытом в этом описании, оказываются в 2-3 раза более высокими, чем ранее опубликованные результаты.

Примечания

В некоторых случаях пмоли/л были использованы как единицы измерения РУУ; в других анализах использованы пг/мл. Переводной коэффициент представляет собой пикомоли/л·4,05 = пг/мл.

В некоторых случаях на графиках показаны точки 150 мин. Строго говоря, они относятся к периоду после еды и поэтому могут искажать оценки фармакокинетики. Однако неожиданное наблюдение, описанное более детально ниже, состоит в том, что точка времени 30 мин после еды не отличается от исходного значения.

Концентрации РУУ в плазме

Анализ РУУ, раскрытый в этом описании, был апробирован по анализу концентрации РУУ в плазме. При использовании этого анализа пробы из каждой временной точки анализировали в трех параллелях. Надо иметь в виду, что 3 из 180 точек данных (1,6%) оказываются "выпадающими" как биологически бессмысленные. В данных для всего этого предварительного анализа эти точки данных были удалены.

Таблица 9. Описательные параметры фармакокинетики
Рассчитанные параметры фармакокинетики включают в себя

	$T_{\max}$ (мин.)	$C_{\max}$ (пг/мл)	$AUC_{0-\text{last}}$ (мин.*пг/мл)	$AUC_{0-\text{inf}}$ (мин.*пг/мл)	$T_{1/2}$ (мин.)
20	60	47	3850		
50	18	89	4960	12379	112
100	32	342	26535	41102	27
150	23	530	31659	39476	39
200	23	683	34823	48618	42

Из исследования средних графиков фармакокинетики следует, что реакция на дозу существует для доз 50-200 мкг, а для дозы 20 мкг реакция находится в пределах шума. Поэтому, многие из последующих анализов должны быть основаны на данных только для доз 50-200 мкг. Мы также предполагаем, что, из-за того, что РУУ является эндогенной молекулой, AUC_{0-t} является более адекватным показателем, чем $AUC_{0-\text{inf}}$.

$T_{\max}$ и $T_{1/2}$ (период полувыведения):

	$T_{\max}$ (мин.)	$T_{1/2}$ (мин.)
Средние величины для групп с дозами 50 - 200 мкг :	24	55

$T_{\max}$ 24 мин является типичным для интраназального продукта. Период полувыведения 55 мин является значительно более долгим, чем можно ожидать. Опубликованные ссылки показывают, что $t_{1/2}$ в типичных случаях составляет 5-10 мин. На период полувыведения могут также влиять некоторое продолжающееся поглощение из слизистой оболочки носовой полости, происходящее после времени $T_{\max}$, и компоненты препарата, которые влияют на метаболизм пептида. Или же из-за того, что анализ, раскрытый в этом описании, использует процедуру экстракции, этот анализ должен охватывать как свободный, так связанный с белками РУУ, в то время как анализ, который не использует экстракцию, может определять главным образом свободную фракцию.

Из этого анализа средних изменений по визуальной аналоговой шкале VAS от исходного уровня (средние величины в моменты 10, 30 и 60 мин минус исходное значение) в зависимости от дозы, можно отметить:

в случае VAS Q1 "Насколько голодным вы себя чувствуете?," субъекты были менее голодными после получения более высоких доз РУУ;

в случае VAS Q3 "Как много, по вашему мнению, вы можете съесть?", субъекты думали, что они могут съесть меньше, после получения более высоких доз РҮҮ.

Однако, в случае VAS Q2 "Насколько сытым вы себя чувствуете?", субъекты чувствовали себя менее сытыми после получения более высоких доз РҮҮ.

Из этого следует, что ощущения после введения РҮҮ не включают в себя ощущение сытости, вздутия или чрезмерной сократимости желудка.

Пример 86. Введение РҮҮ человеку и потеря массы.

Был изготовлен нижеследующий интраназальный препарат РҮҮ.

Реагент	Марка	Поставщик	№ по каталогу	№ партии	F.W.	мг/мл	%
Хлорбутанол, безводный	NF	Spectrum	CH123	RI1646	177,46	2,5	0,25
Метил-β-циклодекстрин		Sigma	C-4555	81K1179		45	4,5
L-α-Фосфатидилхолин-дидеканоил		Sigma	P-7081	55H8377	565,7	1	0,1
Двухосновный эдетат натрия	USP	Dow Chemicals		1034N-00269-2	372,2	1	0,1
Дигидрат цитрата натрия	USP	Spectrum	S0165	RH1056	294,1	1,6	0,16
Лимонная кислота, безводная	USP	Sigma	C-1857	062K003	192,13	0,9	0,09
РҮҮ 3-36, свободный от эндотоксина		Phoenix	059-02	420338	4049,71	2	0,2
Очищенная вода							

РН препарата: 5 +/- 0,25

На протяжении десятидневного периода человеку вводились по одной или по две дозы спрея в день и была зарегистрирована потеря веса в 2,5 фунта. На протяжении периода от 10 мин до 12 ч после введения препарата субъект ощущал снижение голода.

Пример 9. Защечный препарат РҮҮ3-36 (предположительно).

Двухслойные таблетки изготавливают следующим образом. Адгезивный слой получают взвешиванием 70 ч. по массе полиэтиленоксида (Polyox 301N; Union Carbide), 20 мас.ч. полиакриловой кислоты (Carbopol 934P; B.F. Goodrich) и 10 мас.ч. сжимаемого наполнителя, представляющего собой ксилитол/карбоксиметилцеллюлозу (Xylitab 200; Wygofin). Эти ингредиенты смешивают перекачиванием в сосуде в течение 3 мин. Эту смесь затем переносят на испарительную тарелку и быстро подвергают влажной грануляции с абсолютным этанолом до консистенции жидкого теста. Эту массу незамедлительно и в быстром темпе продавливают через сито из нержавеющей стали с сеткой 14 меш (отверстия 1,4 мм), к которому пристают влажные гранулы. Сито покрывают перфорированной алюминиевой фольгой и влажные гранулы сушат в течение ночи при 30°C. Сухие гранулы снимают с первого сита и затем пропускают через сито с сеткой 20 меш (отверстия 0,85 мм) для дополнительного снижения размера гранул. Частицы, которые не прошли через сито с сеткой 20 меш, в течение короткого времени растирают в ступке пестиком, чтобы измельчить частицы, и затем пропускают через сито с сеткой 20 меш. После этого образовавшиеся гранулы помещают в сосуд для перемешивания и к ним добавляют 0,25 мас.ч. стеариновой кислоты и 0,06 мас.ч. мятного вкусового агента (Universal Flavors) и смешивают с гранулами. Конечными мас. процентами этих ингредиентов являются, таким образом, 69,78% полиэтиленоксида, 9,97% сжимаемого наполнителя ксилитол/карбоксиметилцеллюлоза, 19,94% полиакриловой кислоты, 0,25% стеариновой кислоты и 0,06% мятного вкусового агента. 50 мг этой смеси помещают на пуансон с диаметром 0,375 дюйма и предварительно прессуют на аппарате Carver Press Model C при давлении в 0,25 метрических тонн в течение 3 с с получением адгезивного слоя.

Активный слой получают взвешиванием 49,39 мас.ч. маннита, 34,33 мас.ч. гидроксипропилцеллюлозы (Klucel L F; Aqualon, Wilmington, Del.) и 15,00 мас.ч. таурохолата натрия (Aldrich, Milwaukee, Wis.) и перемешиванием перекачиванием в сосуде в течение 3 мин. Эту смесь затем переносят на испаритель-

ную тарелку и быстро подвергают влажной грануляции с абсолютным этанолом до консистенции жидкого теста. Эту массу незамедлительно и в быстром темпе продавливают через сито из нержавеющей стали с сеткой 14 меш, к которому пристают влажные гранулы. Сито накрывают перфорированной алюминиевой фольгой и гранулы сушат при 30°C. Сухой гранулированный материал затем пропускают последовательно через сита с сетками 20, 40 (отверстия 0,425 мм) и 60 (отверстия 0,25 мм) меш для дополнительного уменьшения размера частиц. Частицы, которые не проходят через сито, в течение короткого времени растирают в ступке пестиком, чтобы уменьшить размер частиц, и затем пропускают через сито. Просеянные частицы взвешивают и затем к сухому гранулированному материалу последовательно при геометрическом разбавлении примешивают 0,91 мас.ч. РУУ3-36 и 0,06 мас.ч. желтого красителя FD&C и алюминиевого красного красителя #6НТ. Окрашенный гранулированный материал затем помещают в сосуд для смешивания и смешивают с 0,25 мас.ч. стеарата магния (смазка) и 0,06 мас.ч. мятного вкусового агента перекачиванием в течение 3 мин. Порцию этого материала в 50 мг помещают сверху частично прессованного адгезивного слоя и затем оба слоя прессуют при давлении в 1,0 т в течение 3 с с получением двухслойной таблетки, предназначенной для защечного употребления.

В результате этой процедуры получают десенную таблетку, причем активный слой содержит 0,91 мас.% РУУ3-36, 15 мас.% NaTC и 84,09 мас.% наполнителя, смазки, красителя, вспомогательных веществ получения или вкусовых агентов.

Пример 10.

Было проведено исследование для сравнения способности не содержащего эндотоксин РУУ 3-36 и содержащего эндотоксин РУУ 3-36 проникать через бронхиальный эпителий в соответствии с процедурой примера 1. Было определено, что приблизительно двукратное количество не содержащего эндотоксин РУУ3-36 проникает через бронхиальный эпителий по сравнению с препаратом РУУ3-36, который содержит эндотоксин.

Оба препарата содержали хлорбутанол (2,5 мг/мл), DDPC (2 мг/мл), альбумин (10 мг/мл) ЭДТА (1 мг/мл) и М-В-CD (45 мг/мл). Один препарат содержал РУУ3-36, не содержащий эндотоксин, а другой препарат содержал 70 или больше ед. эндотоксина.

Средний результат по МТТ у препарата РУУ3-36, содержащего эндотоксин, был 91,72%, в то время как РУУ3-36, не содержащий эндотоксин, имел средний результат по МТТ 100,16%.

Средняя проникающая способность препарата РУУ3-36, содержащего эндотоксин, была 5,36%, в то время как средняя проникающая способность препарата РУУ3-36, не содержащего эндотоксин, была 10,75%.

Множество известных наполнителей, способствующих доставке через слизистые оболочки, можно эффективно комбинировать с не содержащими эндотоксин пептидами, связывающимися с Y2-рецепторами, особенно со свободным от эндотоксина РУУ3-36, и можно использовать для улучшения неинфузионных препаратов, особенно для пероральной доставки. Такие наполнители содержатся в нижеследующих заявках на патент, включенных в настоящую посредством ссылки: заявки на патент США 20030225300, 20030198658, 20030133953, 20030078302, 20030045579, 20030012817, 20030008900, 20020155993, 20020127202, 20020120009, 20020119910, 20020065255, 20020052422, 20020040061, 20020028250, 20020013497, 20020001591, 20010039258, 20010003001.

Пероральный препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами

Пероральный препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, можно получать в соответствии с нижеследующей процедурой. Предпочтительный препарат для пероральной доставки содержит приблизительно 0,5 мг/кг не содержащего эндотоксин РУУ и приблизительно от 100 до 200 мг/кг одного или нескольких наполнителей, способствующих доставке через слизистые оболочки.

(Предположительно)

Пример 11. Получение N-циклогексаноилфенилаланинового альдегида.

Метиловый сложный эфир фенилаланина (1 г, 0,0046 моль) растворяют в пиридине (5 мл). Добавляют циклогексаноилхлорид (0,62 мл) и перемешивают эту смесь в течение 2 ч. Эту реакционную смесь вливают на соляную кислоту (1 н) и толченый лед. Водную смесь дважды экстрагируют толуолом. Объединенные толуольные экстракты концентрируют в вакууме с получением 1,1 г неочищенного метилового сложного эфира N-циклогексаноилфенилаланина.

Метиловый сложный эфир N-циклогексаноилфенилаланина (0,5 г) растворяют в диметиловом простом эфире этиленгликоля (20 мл). Этот раствор охлаждают до 70°C и добавляют к нему диизобутилламина гидрид (2,04 мл 1,5 М раствора в толуоле). Получившуюся реакционную смесь перемешивают при -70°C в течение 2 ч. Эту реакционную смесь гасят добавлением 2 н соляной кислоты каплями. Смесь экстрагируют холодным этилацетатом. Этилацетатный раствор промывают солевым раствором и сушат над сульфатом натрия. Концентрирование в вакууме дает белое твердое вещество, которое очищают хроматографией на силикагеле. ¹H-ЯМР (300 МГц, DMSO-d₆): 9,5 (s, 1H), 8,2 (d, 1H), 7,2 (m, 5H), 4,2 (m, 1H), 3,2 (d, 1H), 2,7 (d, 1H), 2,1 (m, 1H), 1,6 (br.m, 4H), 1,2 (br.m, 6H). R (KBr): 3300, 3050, 2900, 2850, 2800, 1700, 1600, 1500 см⁻¹.

Масс-спектрометрия: M+1 m/e 261.

Пример 12. Получение N-ацетилфенилаланинового альдегида.

Метиловый сложный эфир N-ацетилфенилаланина (4,2 г, 19 ммоль) растворяют в диметилевого простом эфире этиленгликоля. Этот раствор охлаждают до -70°C и к нему добавляют диизобутилалюминия гидрид (25,3 мл 1,5 М раствора в толуоле, 39 ммоль). Получившуюся реакционную смесь перемешивают при -70°C в течение 2 ч. Эту реакционную смесь гасят добавлением 2 н соляной кислоты. Смесь экстрагируют 4 раза холодным этилацетатом и 4 раза толуолом. Экстракты комбинируют, промывают рассолом и сушат над сульфатом магния. Концентрирование в вакууме с последующей хроматографией на силикагеле дает 2,7 г белого твердого вещества. ЯМР соответствует опубликованной информации, *Biochemistry*, 18: 921-926 (1979).

Пример 13. Получение 3-ацетида-4-(п-гидрокси)фенил-2-бутанона(N-ацетилтирозинона).

Смесь тирозина (28,9 г, 16 ммоль), уксусного ангидрида (97,9 г, 96 ммоль) и пиридина (35 г, 16 ммоль) нагревают до 100°C в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрируют в вакууме с получением желтого масла. Это масло дистиллируют при сниженном давлении для получения 29,9 г масла.

^1H -ЯМР (DMSO-d_6): ЯМР (d_6 -ДМСО); 8,2 (d, 1H), 7,3 (d, 2H), 7,0 (d, 2H), 4,4 (m, 1H), 3,1 (dd, 1H), 2,7 (dd, 1H), 2,3 (s, 3H), 1,8 (s, 3H).

Пример 14. Получение 3-ацетида-7-амино-2-бутанона (N-ацетиллизина).

Следуя процедуре примера 13, лизин превращают в N-ацетиллизин.

^1H ЯМР (DMSO-d_6): 8,1 (d, 1H), 7,8 (br.m. 1H), 4,1 (m, 1H), 3,0 (m, 2H), 2,0 (s, 3H), 1,9 (s, 3H) и 1,3 (br.m, 6H).

Пример 15. Получение 3-ацетида-5-метил-2-бутанон (N-ацетиллейцина).

Следуя процедуре примера 13, лейцин превращают в N-ацетиллейцин.

^1H -ЯМР (DMSO-d_6): 8,1 (d, 1H), 4,2 (m, 1H), 2,0 (s, 3H), 1,8 (s, 3H), 0,8 (d, 6H).

Пример 16. Модификация 4-(4-аминофенил)-масляной кислоты при использовании бензолсульфонилхлорида.

4-(4-Аминофенил)-масляную кислоту (20 г, 0,11 моль) растворяют в 110 мл водного 2 н раствора гидроксида натрия. После перемешивания приблизительно в течение 5 мин при комнатной температуре в раствор аминокислоты добавляют каплями бензолсульфонилхлорид (14,2 мл, 0,11 моль) на протяжении 15 мин. После перемешивания на протяжении примерно 3 ч при комнатной температуре смесь подкисляют до pH 2 добавлением соляной кислоты. Это дает светло-коричневый осадок, который отделяют фильтрованием. Осадок промывают теплой водой и сушат. Точка плавления: $123-25^{\circ}\text{C}$.

Если необходимо, модифицированные аминокислоты можно очищать перекристаллизацией и(или) хроматографией.

Пример 17. Модификация 4-аминобензойной кислоты при использовании бензолсульфонилхлорида.

Следуя процедуре примера 16, 4-аминобензойную кислоту превращают в 4-(фенилсульфонамидо)бензойную кислоту.

Пример 18. Модификация 4-аминофенилуксусной кислоты, 4-аминогиппуровой кислоты и 4-аминометилбензойной кислоты при использовании бензолсульфонилхлорида.

Следуя процедуре примера 16, 4-аминофенилуксусную кислоту, 4-аминогиппуровую кислоту и 4-аминометилбензойную кислоту превращают в 4-(фенилсульфонамидо)фенилуксусную кислоту, 4-(фенилсульфонамидо)гиппуровую кислоту и 4-(фенилсульфонамидометил)бензойную кислоту, соответственно.

Пример 19. Модификация аминокислот бензолсульфонилхлоридом.

Смесь шестнадцати аминокислот получают до химической модификации. Состав этой смеси суммирован в нижеприведенной таблице. 65 г смеси аминокислот (суммарная концентрация по группам $[-\text{NH}_2] = 0,61$ моль) растворяют в 760 мл 1 н раствора гидроксида натрия (0,7625 эквивалентный) при комнатной температуре. После перемешивания в течение 20 мин добавляют бензолсульфонилхлорид (78 мл, 1 экв.) на протяжении 20 мин. Эту реакционную смесь затем перемешивают в течение 2,5 ч без нагревания. Поскольку может происходить некоторая преципитация, к этому раствору можно добавлять дополнительный раствор NaOH (2 н) до достижения pH 9,3. Эту реакционную смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. После этого смесь подкисляют при использовании разбавленной соляной кислоты (38%, 1:4) и появляется осадок кремового цвета. Получившийся осадок отделяют декан-тированием и растворяют в гидроксида натрия (2 н). Этот раствор высушивают в вакууме с получением желтого твердого вещества, которое сушат в лиофилизаторе.

Таблица 10. Аминокислотный состав
Число молей

Аминокислота	Масса (г)	% от общей массы	каждой аминокислоты ($\times 10^{-2}$)	число молей по $[-NH_2]$
Thr	2,47	3,8	2,07	2,07
Ser	2,25	3,46	2,1	2,1
Ala	4,61	7,1	5,17	5,17
Val	4,39	6,76	3,75	3,75
Met	0,53	0,82	0,35	0,35
Ile	2,47	3,8	0,36	0,36
Leu	3,86	5,94	2,95	2,95
Tyr	1,03	1,58	0,56	0,56
Phe	4,39	6,76	0,27	0,27
His	2,47	3,8	1,6	3,2
Lys	4,94	7,6	3,4	6,8
Arg	5,13	7,9	2,95	5,90
Глутамин	9,87	15,18	6,76	13,42
Глутаминовая кислота	9,87	15,18	6,70	6,70
Аспарагин	3,32	5,11	2,51	5,02
Аспарагиновая кислота	3,32	5,11	2,50	2,50

Пример 20. Модификация смеси пяти аминокислот при использовании бензолсульфонилхлорида.

86,1 г (0,85 моль по NH_2) смеси аминокислот (см. таблицу ниже) растворяют в 643 мл (1,5 экв.) водного 2 н раствора гидроксида натрия. После перемешивания в течение 30 мин при комнатной температуре в раствор аминокислот добавляют порциями бензолсульфонилхлорид (108 мл, 0,86 моль) в течение периода в 15 мин. После перемешивания в течение 2,5 ч при комнатной температуре pH реакционной смеси (pH 5) доводят до pH 9 дополнительным 2 н раствором гидроксида натрия. Эту реакционную смесь перемешивают в течение ночи при комнатной температуре. После этого pH реакционной смеси доводят до pH 2,5 добавлением разбавленного водного раствора соляной кислоты (4:1, H_2O : HCl), и образуется осадок модифицированных аминокислот. Верхний слой отбрасывают и получившийся желтый осадок отделяют декантированием, промывают водой и растворяют в 2 н гидроксиде натрия (2 н). Этот раствор высушивают в вакууме с получением желтого твердого вещества, которое лиофилизируют в течение ночи.

Таблица 11
Моли аминокислоты
Моли $[-NH_2]$

Аминокислота	($\times 10^{-2}$)	$\times 10^{-2}$
Валин	7,5	7,5
Лейцин	10,7	10,5
Фенилаланин	13,4	13,4
Лизин	21,0	42,0
Аргинин	6,0	12,0

Пример 21. Модификация смеси пяти аминокислот при использовании бензоилхлорида.

86 г (0,85 моль по NH_2) смеси аминокислот (см. таблицу в примере 20) растворяют в 637 мл (1,5 экв.) водного 2 н раствора гидроксида натрия. После перемешивания в течение 10 мин при комнатной температуре в этот раствор аминокислот добавляют порциями бензоилхлорид (99 мл, 0,85 моль) в течение периода в 10 мин. После перемешивания в течение 2,5 ч при комнатной температуре pH реакционной смеси (pH 12) доводят до pH 2,5 при использовании разбавленной соляной кислоты (4:1, $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$), и образуется осадок модифицированных аминокислот. После отстаивания в течение 1 ч получившийся осадок отделяют декантированием, промывают водой и растворяют в гидроксиде натрия (2 н). Этот раствор затем высушивают в вакууме с получением неочищенных модифицированных аминокислот в виде белого твердого вещества (ожидаемый выход 220,5 г).

Пример 22. Модификация L-валина при использовании бензолсульфонилхлорида.

L-Валин (50 г, 0,43 моль) растворяют в 376 мл (0,75 экв.) водного 2 н гидроксида натрия перемешиванием при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем к раствору аминокислоты добавляют бензолсульфонилхлорид (68,7 мл, 0,38 моль, 1,25 экв.) на протяжении 20 мин при комнатной температуре. После перемешивания в течение 2 ч при комнатной температуре появляется осадок. Этот осадок растворяют добавлением 200 мл дополнительного 2 н раствора гидроксида натрия. После перемешивания в течение дополнительных 30 мин добавляют разбавленный водный раствор соляной кислоты (4:1, $\text{H}_2\text{O}:\text{HCl}$) пока pH реакционной смеси не достигает 2,6. Образуется осадок модифицированной аминокислоты, и его собирают декантированием. Этот материал растворяют в 2 н гидроксиде натрия и сушат в вакууме с получением белого твердого вещества. Ожидаемый выход неочищенных модифицированных аминокислот составляет 84,6 г (77%).

Пример 23. Модификация метилового сложного эфира фенилаланина при использовании гиппурилхлорида.

Гидрохлорид метилового сложного эфира L-фенилаланина (15 г, 0,084 моль) растворяют в диметилформамиде (100 мл) и к этому раствору добавляют пиридин (30 мл). К раствору сложного эфира аминокислоты немедленно двумя порциями добавляют раствор гиппурилхлорида (16,6 г, 0,084 моль в 100 мл диметилформамида). Эту реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь затем упаривают в вакууме и растворяют в 1 н водном растворе гидроксида натрия. Этот раствор нагревают при 70°C в течение 3 ч для того, чтобы гидролизовать метиловый сложный эфир до свободной карбоксильной группы. После этого раствор подкисляют до pH 2,25 при использовании разбавленного водного раствора соляной кислоты (1:3 $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}$). Образуется похожий на смолу осадок, и его собирают и растворяют в 1 н гидроксиде натрия. Этот раствор упаривают в вакууме с получением ожидаемых 18,6 г продукта, представляющего собой неочищенную модифицированную аминокислоту. После перекристаллизации из ацетонитрила получают чистый модифицированный фенилаланин (ожидаемый выход 12 г) в виде белого порошка. Т. пл. 223-225°C.

Пример 24. Получение вводимых растворов РУУ(3-36).

В пробирку к 2,9 мл 15% этанола добавляют 568 мг ацетилфенилаланинового альдегида, 132 мг карбометоксифенилаланиллейцина и 100 мг альдегида ацетил-Phe-Leu-Leu-Arg. Этот раствор перемешивают и к нему добавляют NaOH (1,0 н) для повышения pH до 7,2. Добавляют воду для доведения суммарного объема до 4,0 мл. Проба имела концентрацию носителя, составляющую 200 мг/мл. К этому раствору добавляют РУУ(3-36) (800 мкг). Суммарная концентрация РУУ3-36 составляет 200 мкг/мл.

Следуя такой же процедуре, готовят второй раствор, содержащий 668 мг ацетилфенилаланинового альдегида и 132 мг карбометоксифенилаланиллейцина в качестве носителя композиции, и третий раствор, содержащий в качестве носителя ацетилфенилаланиновый альдегид. Каждый раствор имел концентрацию РУУ(3-36), не содержащего эндотоксин, составляющую 200 мкг/мл.

Пример 25. Получение композиций модифицированных аминокислот/РУУ(3-36).

Получение микросфер, состоящих из модифицированных аминокислот и содержащих инкапсулированный РУУ3-36, не содержащий эндотоксин.

Смесь модифицированных аминокислот, полученную в соответствии с примером 19, растворяют при 40°C в дистиллированной воде (pH 7,2) при концентрации 100 мг/мл. Этот раствор затем фильтруют через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм, причем температуру поддерживают при 40°C. РУУ3-36 (Bachem) растворяют в водном растворе лимонной кислоты (1,7 н) и желатина (5%) при концентрации 150 мг/мл. Этот раствор затем нагревают до 40°C. Эти два нагретых раствора затем смешивают в соотношении 1:1 (объем/объем). Получившуюся суспензию микросфер затем фильтруют через стекловолоконную вату и центрифугируют в течение 50 мин при 1000 g. Осадок снова суспендируют с 0,85 н лимонной кислотой до объема в 5-7 раз меньшего, чем начальный объем. Концентрацию РУУ3-36 в заново суспендированном осадке определяют методом ВЭЖХ. Дополнительные микросферы изготавливают в соответствии с вышеуказанной процедурой без РУУ3-36. Эти "пустые микросферы" используют для разбавления препарата инкапсулированного в микросферах РУУ3-36 лосося для готовой вводимой суспензии, если это нужно.

(b) Получение системы: носитель, представляющий собой растворимую модифицированную аминокислоту/РУУ3-36.

Вводимый препарат растворимых аминокислот, содержащий РУУ3-36, получают растворением материала, представляющего собой модифицированную аминокислоту, в дистиллированной воде (рН 8) до надлежащей концентрации. Этот раствор нагревают до 40°C и затем фильтруют через фильтр с порами диаметром 0,2 мкм. К раствору модифицированной аминокислоты перед пероральным введением добавляют РУУ3-36, также растворенный в дистиллированной воде.

Пulьмонарная доставка РУУ3-36.

(Предположительно)

Соединения-носители, полученные как описано ниже, можно использовать прямо в качестве средства доставки простым перемешиванием одного или нескольких соединений или солей, полимеров аминокислот или пептидов с не содержащим эндотоксин пептидом, связывающимся с Y2-рецепторами, для пульмонарной доставки.

Смеси для введения получают перемешиванием водного раствора носителя с водным раствором активного ингредиента непосредственно перед введением. Или же носитель и биологически или химически активный ингредиент можно смешивать во время процесса изготовления. Растворы могут содержать добавки по выбору, такие как соли, представляющие собой фосфатный буфер, лимонную кислоту, уксусную кислоту, желатин и гуммиарабик.

Многие известные методы пульмонарной доставки могут использовать не содержащие эндотоксин пептиды, связывающиеся с Y2-рецепторами, особенно РУУ3-36, для улучшения доставки РУУ в легкие. Нижеследующие неограничивающие заявки на патент включены в настоящую посредством ссылки: заявки на Патент США 20030223939, 20030215514, 20030215512, 20030209243, 20030203036, 20030198601, 20030183228, 200301885765, 20030150454, 20030124193, 20030094173.

Пример 26. Получение носителей.

Получение 2-(4-(N-салицилоил)аминофенил)пропионовой кислоты (Носитель В).

Взвесь 58,6 г (0,355 моль) 2-(4-аминофенил)пропионовой кислоты и 500 мл метиленхлорида обрабатывают триметилсилилхлоридом в количестве 90,11 мл (77,13 г, 0,710 моль) и нагревают до температуры дефлегмации в течение 120 мин. Эту реакционную смесь охлаждают до 0°C и обрабатывают триэтиламином в количестве 184,44 мл (107,77 г, 1,065 моль). После перемешивания в течение 5 мин эту смесь обрабатывают раствором 70,45 г (0,355 моль) О-ацетилсалицилоилхлорида и метиленхлоридом (150 мл). Реакционную смесь нагревают до 25°C и перемешивают в течение 64 ч. Удаляют в вакууме летучие вещества. Остаток перемешивают в 2 н водном растворе гидроксида натрия в течение 1 ч и подкисляют 2 М водным раствором серной кислоты. Твердое вещество дважды перекристаллизовывают из смеси этанол/вода с получением светло-коричневого твердого вещества. Выделение фильтрованием приводит к ожидаемому выходу 53,05 г (выход 52%) 2-(4-(N-салицилоил)аминофенил)пропионовой кислоты. Свойства. Растворимость: 200 мг/мл: 200 мг+350 мкл 2 н NaOH+650 мкл H₂O-рН-7,67. Анализ: С, 67,36; Н, 5,3; N, 4,91.

Получение 2-(4-(N-салицилоил)аминофенил)пропионата натрия (Натриевая соль Носителя В).

Раствор 53,05 г (0,186 моль) 2-(4-(N-салицилоил)аминофенил)пропионовой кислоты и 300 мл этанола обрабатывают 7,59 г (0,190 моль) NaOH, растворенного в 22 мл воды. Эту реакционную смесь перемешивают в течение 30 мин при 25°C и в течение 30 мин при 0°C. Получившееся бледно-желтое твердое вещество выделяют фильтрованием с получением 52,61 г 2-(4-(N-салицилоил)аминофенил)пропионата натрия. Свойства. Растворимость: 200 мг/мл прозрачный раствор, рН=6,85. Анализ С, 60,45; Н, 5,45; N, 3,92; Na, 6,43. Точка плавления 236-238°C.

Получение натриевой соли (Носитель С).

В двухлитровую круглодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой и дефлегматором, загружают суспензию 3-(4-аминофенил)пропионовой кислоты (15,0 г, 0,084 моль, 1,0 эквивалента) в дихлорметане (250 мл). Хлортриметилсилан (18,19 г, 0,856 моль, 2,0 эквивалента) добавляют одной порцией и смесь нагревают при температуре дефлегмации в течение 1,5 ч в атмосфере аргона. Реакционной смеси дают остыть до комнатной температуры и помещают ее на ледяную баню (внутренняя температура <10°C). Дефлегматор заменяют на входную воронку, содержащую триэтиламин (25,41 г., 0,251 моль, 3,0 эквивалента). Триэтиламин добавляют каплями на протяжении 15 мин, и во время добавления образуется желтое твердое вещество. Воронку заменяют на другую входную воронку, содержащую раствор 2,3-диметоксибензоилхлорида (18,31 г, 0,091 моль, 1,09 эквивалента) в дихлорметане (100 мл). Этот раствор добавляют каплями на протяжении 30 мин. Реакционную смесь перемешивают на ледяной бане еще 30 мин и при температуре окружающей среды в течение 3 ч. Дихлорметан упаривают в вакууме с получением коричневого масла. Охлаждают коричневое масло на ледяной бане и добавляют ледяной раствор насыщенного бикарбоната натрия (250 мл). Ледяную баню убирают и реакционную смесь перемешивают 1 ч с получением прозрачного коричневого раствора. Этот раствор подкисляют концентрированной HCl и выдерживают приблизительно в условиях окружающей среды при примерно SC в течение 1 ч. Смесь экстрагируют дихлорметаном (3 раза, 100 мл), сушат над сульфатом натрия, соли отфильтровывают и дихлорметан удаляют в вакууме. Получившееся твердое вещество перекристаллизовывают из 50% раствора этилацетата в воде (объем/объем) с получением кислоты, представляющей собой Носитель С, в виде беловатых игл (25,92 г, 90%). Анализ для C₁₉H₂₁NO₅: С, 66,46; Н, 6,16; N, 4,08; т. пл.=99-102°C.

12 г кислоты, представляющей собой Носитель С, растворяют в этаноле (75 мл) при нагревании. К этому раствору добавляют 8,5 М раствор гидроксида натрия (1,02 молярных эквивалентов, 1,426 г в 4,5 мл воды). Эту смесь перемешивают в течение 15 мин. Приблизительно три четверти этанола удаляют в вакууме и к получившемуся маслу добавляют н-гептан, 100 мл, что вызывает образование осадка. Твердое вещество сушат в вакууме при 50°C. Анализ: $C_{19}H_{20}NO_3Na$ 0,067H₂O: С, 62,25; Н, 5,54; N, 3,82; Na, 6,27.

Получение N-(4-метилсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты (Носитель D).

(а) Получение олиго(4-метилсалицилат)а.

Уксусный ангидрид (32 мл, 34,5 г, 0,338 моль, 1,03 экв.), 4-метилсалициловую кислоту (50 г, 0,329 ммоль, 1,00 экв.) и ксилолы (100 мл) добавляют в однолитровую, четырехгорлую колбу, снабженную стержнем для магнитной мешалки, термометром и дефлегматором. Помещают колбу на песочную баню и начинают нагревать мутно-белую смесь. Реакционная смесь превращается в прозрачный желтый раствор приблизительно при 90°C. Большую часть летучих органических веществ (ксилолы и уксусная кислота) отгоняют в ловушку Дина-Старка в течение 3 ч (135-146°C). Отгонку продолжают еще час (в сумме 110 мл дистилята), во время которого температура в сосуде медленно повышается до 204°C и дистиляция замедляется до тонкой струйки. Остаток вливают в горячем состоянии на алюминиевый лоток. При охлаждении образуется ломкое желтое стекло. Это твердое вещество размельчают в тонкий порошок. Полученный олиго(4-метилсалицилат) используют без дополнительной очистки.

(б) Получение N-(4-метилсалицилоил)-8-аминокаприловой кислоты.

7М раствор карбоната калия (45 мл, 43,2 г, 0,313 моль, 0,95 экв.), 8-аминокаприловую кислоту (41,8 г, 262 моль, 798 экв.) и воду (20 мл) добавляют в однолитровую круглодонную колбу, снабженную стержнем для магнитной мешалки, дефлегматором и входной воронкой. Белую мутную смесь обрабатывают раствором олиго(4-метилсалицилат)а (44,7 г, 0,329 ммоль, 1,0 экв.) и диоксаном (250 мл), которые добавляют в течение 30 мин. Реакционную смесь нагревают до 90°C в течение 3 ч (по истечении которых взаимодействие определяют по ВЭЖХ как завершенное). Прозрачную оранжевую реакционную смесь охлаждают до 30°C и подкисляют до pH=250%-ным водным раствором серной кислоты (64 г). Получившееся твердое вещество отделяют фильтрованием. Белое твердое вещество перекристаллизовывают из 1170 мл 50% этанола в воде. Твердое вещество собирают фильтрованием и сушат в течение 18 ч при 50°C в вакуумном шкафу. N-(4-метилсалицилоил)-8-аминокаприловую кислоту выделяют в виде белого твердого вещества (30,88 г, 52%); т. пл.=113-114°. Анализ: $C_6H_{23}NO_4$: С, 65,51; Н, 7,90; N, 4,77.

Затем готовят водный раствор РYY(3-36) и смешивают с одним или несколькими носителями с получением композиции РYY(3-36), которую затем можно вводить в виде спрея в легкие. Подходящая концентрация РYY3-36 для получившейся композиции должна составлять около 400 мкг/мл. См. заявку на патент США № 20030072740.

Пример 27. Радиоиммунный анализ суммарного экстракта для определения концентрации РYY в плазме.

1.0 Введение:

Радиоиммунный анализ был разработан для измерения концентрации человеческого пептида YY(3-36) (hPYY) в плазме человека. Пробы собирают с антикоагулянтом (ЭДТА) и ингибитором протеаз (апротинин) и замораживают. Анализ представляет собой четырехдневный процесс. В День 1 пробы, контроли и стандарты экстрагируют в спирт и сушат. В День 2 все пробы восстанавливают и смешивают с поликлональной кроличьей антисывороткой против hPYY. В День 3 добавляют йодированный hPYY. В День 4 добавляют специфичные преципитирующие агенты (козью антисыворотку против кроличьих IgG и нормальную кроличью сыворотку). Связанную метку отделяют от свободной метки центрифугированием и связанную метку просчитывают в гамма-счетчике. Концентрацию вычисляют интерполяцией по стандартной кривой, качество анализа контролируют пробами контроля качества.

2.0 Материалы:

2.1 Набор Peninsula PYY (Peninsula Laboratories, Cat. № S-2043-0001).

2.2 Реагентный спирт (Fisher Inc., Cat. № A995-4) (или эквивалент).

2.3 Обедненная человеческая плазма (с гепарином, от доноров в состоянии натошак, объединенная в пул), Golden West Biotechnologicals Inc. (Cat. №, SD1020-H) (Analytical SOP # A-003).

2.4 Ледяные бани (Fisher, Cat № 11-676-36) (или эквивалент).

2.5 Одноразовые пипетки на 10 мл (Fisher Cat. № 13-678-11E) (или эквивалент).

2.6 Стандартный синтетический человеческий PYY от Nastech QC (3-36) (Bachem Cat. № H8585).

2.7 Дистиллированная вода (Milli-Q Millipore, Cat. № ZMQ56VFT1) (или эквивалент).

2.8 Тритон X-100 (Sigma, Cat. № T-9284) (или эквивалент).

2.9 Алюминиевая фольга (Fisher, Cat. № 01-213-3) (или эквивалент).

2.10 Апротинин (ICN Biomedicals Inc. Cat. № 190779) (или эквивалент).

2.11 Пробирки 12x75 мм (Evergreen Scientific, Cat. № 214-2023-010) (или эквивалент).

2.12 Колпачки для пробирок 12x75 мм (Evergreen Scientific, Cat. № 300-2912-G20) (или эквивалент).

2.13 Пробирки на 1,5 мл для микроцентрифуги (Fisher, Cat. № 05-402-25) (или эквивалент).

3.0 Приборы:

3.1 Автоматический гамма-счетчик Wallac WIZARD 1470 (Perkin Elmer, Модель № 1470-002) (или эквивалент).

3.2 Морозильник Isotemp Basic, -70°C (Kendro Laboratory Products, Модель № C90-3A31) (или эквивалент).

3.3 Концентратор CentriVap (Labconco, Cat. № 7810000) (или эквивалент).

3.4 Перемешиватель для пробирок VX-2500r (VWR, Cat. № 58816-115) (или эквивалент).

3.5 Центрифуга Marathon 21 000R (Fisher, Cat. № 04-977-21 000R) (или эквивалент).

3.6 Бакетный ротатор (Fisher, Cat. № 04-976-006) (или эквивалент).

3.7 Механизированный вспомогательный прибор для пипеток (Fisher, Cat. № 13-681-15E) (или эквивалент).

3.8 Микропипетка Eppendorf.

3.8.1 2 мкл - 20 мкл (Fisher, Cat. № 21-371-6) (или эквивалент).

3.8.2 20 мкл - 200 мкл (Fisher, Cat. № 21-371-10) (или эквивалент).

3.8.3 100 мкл - 1000 мкл (Fisher, Cat. № 21-371-13) (или эквивалент).

3.9 Многоканальный пипеточный отсасыватель Eppendorf (Fisher, Cat. № 21-380-9) (или эквивалент).

3.10 Комбинированные наконечники для многоканального пипеточного отсасывателя Eppendorf.

3.10.1 2,5 мл (Fisher, Cat. № 21-381-331) (или эквивалент).

3.10.2 25 мл (Fisher, Cat. № 21-381-115) (или эквивалент).

3.11 Вытесняющая пипетка положительного давления (Fisher, Cat. № 21-169-10A) (или эквивалент).

4.0 Процедура

ДЕНЬ 1

4.1 Оттаивают необходимые реагенты и пробы для анализа. Готовят буфер для РИА, однократной концентрации (РИАБ), если достаточного количества не хватает.

4.2 Готовят пробы для стандартной кривой в объединенной в пул истощенной человеческой плазме. Их готовят нижеследующим образом, если используют начальную концентрацию 12,8 мкг/мл.

4.2.1 Добавляют 990 мкл РИАБ к пробирке О.

4.2.2 Добавляют 990 мкл плазмы, объединенной в пул, к пробирке А.

4.2.3 Добавляют 500 мкл плазмы, объединенной в пул, к пробиркам В-Н.

4.2.4 Добавляют 10 мкл стандарта 12,8 мкг/мл к пробирке О. Перемешивают.

4.2.5 Добавляют 10 мкл раствора из пробирки О в пробирку А. Перемешивают.

4.2.6 Добавляют 500 мкл раствора из пробирки А в пробирку В. Перемешивают.

4.2.7 Добавляют 500 мкл раствора из пробирки В в пробирку С. Перемешивают.

4.2.8 Повторяют разведения по 4.2.7 до пробирки Н (см. Диаграмму № 1)

4.3 Разбавляют пробы неизвестной человеческой плазмы для тестирования, если необходимо. Пробы следует разбавлять в объединенной в пул истощенной человеческой плазме.

4.4 Добавляют 1,2 мл холодного спирта в пустые пробирки для NSB, ТВ, всех стандартов, проб контроля качества и проб человеческой плазмы для тестирования.

4.5 Добавляют по 400 мкл объединенной в пул истощенной человеческой плазмы в пробирки NSB и ТВ. Закрывают колпачками, перемешивают.

4.6 Добавляют по 400 мкл каждой приготовленной стандартной пробы по 4.2.5-4.2.8 в соответствующие пробирки Н-А для стандартной кривой (см. диаграмму №1). Закрывают колпачками, перемешивают.

4.7 Добавляют по 400 мкл проб для контроля качества в соответствующие пробирки. Закрывают колпачками, перемешивают.

4.8 Добавляют по 400 мкл каждой пробы, подлежащей тестированию, в соответствующие пробирки. Закрывают колпачками, перемешивают.

4.9 Инкубируют все пробы на льду в течение 30-60 мин.

4.10 Включают охлаждающую ловушку на концентраторе.

4.11 Центрифугируют все пробирки при 3000 об/мин при 4°C в течение 15 мин.

4.12 Переносят 1,3 мл супернатанта из каждой пробы в новый набор пустых пробирок. Хранят в ледяной бане или при 2-8°C, если не откручивают немедленно.

4.13 Помещают пробы в концентратор.

4.14 Пробы следует откручивать в течение двух часов при 40°C, затем при температуре окружающей среды, в сумме 5 ч или пока не высохнут.

4.15 Убирают сухие пробы, закрывают их и хранят в течение ночи при 2-8°C.

ДЕНЬ 2

4.16 Вынимают сухие пробирки из холодильника при 2-8°C.

4.17 Добавляют по 100 мкл четырехкратного концентрата буфера для РИА к каждой пробирке.

4.18 Добавляют по 100 мкл 0,6% TX100 к каждой пробирке. (Приложение №1). Перемешивают минимум 30 с, чтобы гарантировать, чтобы все экстракты полностью восстановили влагосодержание.

4.19 Инкубируют все пробы на льду в течение 30-60 мин.

4.20 Добавляют по 200 мкл дистиллированной воды к каждой пробирке. Перемешивают.

4.21 Переносят по 100 мкл экстракта каждой пробы в соответствующую пробирку.

Примечание: NSB, TB, TC, пробы для стандартной кривой и контроля качества в типичных случаях проводят в трех параллелях, что требует три пробирки на пробу. Пробы человеческой плазмы можно тестировать в любом варианте (до трех параллелей), в зависимости от доступности проб.

4.22 Готовят кроличьи анти-РҮҮ как описано во вкладышах к набору Peninsula Laboratories.

4.23 Добавляют по 100 мкл РИАБ к каждой пробирке NSB.

4.24 Добавляют по 200 мкл РИАБ к каждой пробирке TC.

4.25 Добавляют по 100 мкл кроличьих анти-РҮҮ во все остальные пробирки. Перемешивают.

4.26 Закрывают фольгой и хранят в течение ночи при 2-8°C.

ДЕНЬ 3

4.27 Вынимают пробирки из холодильника при 2-8°C.

4.28 Готовят меченый ¹²⁵I-Пептид (Приложение № 2).

4.29 Добавляют 100 мкл приготовленной метки ко всем пробиркам. Закрывают колпачками и перемешивают.

4.30 Хранят в течение ночи при 2-8°C.

ДЕНЬ 4

4.31 Вынимают все пробирки из холодильника при 2-8°C.

4.32 Готовят козью антисыворотку против кроличьих IgG (GARGG) и нормальную кроличью сыворотку (NRS) как описано во вкладыше к набору Peninsula Laboratories.

4.33 Добавляют по 100 мкл GARGG к каждой пробирке (кроме пробирок TC).

4.34 Добавляют по 100 мкл NRS к каждой пробирке (кроме пробирок TC). Перемешивают круговыми движениями.

4.35 Инкубируют 90-120 минут при комнатной температуре.

4.36 Добавляют по 500 мкл РИАБ к пробиркам для немедленного центрифугирования (кроме пробирок TC). Перемешивают круговыми движениями.

Примечание: 500 мкл РИАБ следует добавлять к пробиркам непосредственно перед центрифугированием. Добавляют РИАБ только в число пробирок, которые готовы для центрифугирования. По 500 мкл РИАБ следует добавлять к дополнительным пробиркам, когда они готовы для центрифугирования.

4.37 Центрифугируют пробирки (содержащие 500 мкл РИАБ) при 3000 об./мин при 4°C в течение 15 мин. Не центрифугируют пробирки TC.

4.38 Отсасывают супернатант из отцентрифугированных пробирок.

4.39 Помещают пробирки в подписанные черные штативы для просчета в гамма-счетчике. Первый штатив должен иметь прикрепленный номер соответствующей программы. Все следующие штативы не должны иметь номер программы. Пробы надо добавлять в нижеследующем порядке:

4.39.1 Пробирки NSB

4.39.2 Пробирки TB

4.39.3 Пробирки TC

4.39.4 Пробирки стандартов (в порядке увеличения концентрации)

4.39.5 Пробы для контроля качества (3 концентрации)

4.39.6 Неизвестные человеческие пробы

4.39.7 Пробы для контроля качества (3 концентрации)

4.40 Помещают пустой черный поднос с прикрепленной стоп-меткой после всех проб, подлежащих счету.

4.41 Нажимают кнопку 'Start' на клавиатуре гамма-счетчика, чтобы начать счет.

4.42 Нажимают кнопку 'E' на клавиатуре гамма-счетчика для вывода результатов в импульсах в минуту (имп./мин.).

5.0 Оценка результатов

5.1 Нижеследующие указания применяют для идентификации выпадающих проб и отказа от них в анализе. Для того чтобы квалифицировать результат как выпадающий и не включать его в окончательное вычисление результатов, должны быть соблюдены все нижеследующие условия:

5.1.1 Пробы контроля качества и неизвестные пробы:

5.1.1.1 Процентное соотношение CV всех параллелей должно быть больше, чем 20%.

5.1.1.2 Для оценки необходимо получить, по крайней мере, три результата.

5.1.1.3 Разница между предположительной выпадающей пробой и ближайшим к ней результатом должна быть больше чем 20%.

5.1.1.4 Разница между высшим и низшим оставшимися результатами должна быть меньше чем 20%.

5.1.2 Пробы для стандартной кривой:

5.1.2.1 Процентное соотношение CV всех параллелей должно быть больше чем 15%.

5.1.2.2 Для оценки необходимо получить, по крайней мере, три результата.

5.1.2.3 Разница между предположительной выпадающей пробой и ближайшим к ней результатом должна быть меньше чем 15%.

5.1.2.4 Разница между высшим и низшим оставшимися результатами должна быть меньше чем 15%.

6.0 Спецификации анализа

6.1 Пробы для контроля качества QC получают при нижеследующих концентрациях. Две пробы для контроля качества при каждой концентрации тестируют в анализе. Четыре из шести тестируемых проб для контроля качества должны быть в пределах нижеследующих диапазонов ($\pm 30\%$ номинальной концентрации). По меньшей мере одна из двух проб для контроля качества, тестируемых при любой концентрации, должна быть в пределах диапазона анализа данных, чтобы они были приемлемыми.

6.1.1 КК1 (100 пг/мл) 70-130 пг/мл

6.1.2 КК2 (200 пг/мл) 140-260 пг/мл

6.1.3 КК3 (500 пг/мл) 350-650 пг/мл

6.2 Требования для параметров стандартной кривой TBD

Диаграмма №1

РИА стандарта РYУ:

Обозначение пробирки	Концентрация стандарта
A	1280 пг/мл
B	640 пг/мл
C	320 пг/мл
D	160 пг/мл
E	80 пг/мл
F	40 пг/мл
G	20 пг/мл
H	10 пг/мл

Приложение № 1

0,6% TX-100

Реагент: 0,6% TX-100

Материалы: Дистиллированная вода Milli-Q

TX-100

Получение: 1) Отмеряют 50 мл дистиллированной воды Milli-Q.

2) Добавляют 300 мкл TX-100 при использовании вымещающей пипетки положительного давления.

3) Хорошо перемешивают.

Приложение № 2

Метка, представляющая собой ^{125}I -Пептид РYУРеагент: Метка, представляющая собой ^{125}I -Пептид РYУМатериалы: Однократный буфер для РИА ^{125}I -Пептид РYУ

Получение 1) Восстанавливают метку 1 мл однократного буфера для РИА.

2) Измеряют количество метки на гамма-счетчике. Переносят 10 мкл восстановленной метки в пробирку. Помещают ее в гамма-счетчик в черном штативе с прикрепленным номером программы № 30.

3) Помещают штатив в гамма-счетчик со стоп-штативом позади.

4) Нажимают кнопку "Start" для начала счета, затем кнопку "E" для вывода результатов в имп./мин.

5) Определяют необходимое количество метки (X мкл) для получения и количество РИАБ (Y мл) нижеследующим образом:

$$X \text{ мкл} = (5 \text{ мкл})(\text{имп./мин.})(\text{число пробирок} + 10) (\text{имп./мин. для маточного раствора})$$

$$Y \text{ мл} = (0,1) (\text{число пробирок} + 10)$$
6) Соединяют X мкл ^{125}I -Пептида YУ с Y мл РИАБ. Хорошо перемешивают.

Пример 28. Получение препарата NPY, не содержащего стабилизатор, являющийся белком.

Препарат РYУ, подходящий для интраназального введения NPY, по сути не содержащий стабилизатор, являющийся белком, получают при наличии препаратов, перечисленных ниже.

12. Около 3/4 воды добавляют в химический стакан и перемешивают на магнитной мешалке и добавляют цитрат натрия до полного растворения.

13. Затем добавляют ЭДТА и перемешивают до полного растворения.

14. Затем добавляют лимонную кислоту и перемешивают до полного растворения.

15. Добавляют метил- β -циклодекстрин и перемешивают до полного растворения.

16. Затем добавляют DDPC и перемешивают до полного растворения.

17. Затем добавляют лактозу и перемешивают до полного растворения.

18. Затем добавляют сорбит и перемешивают до полного растворения.

19. Затем добавляют хлорбутанол и перемешивают до полного растворения.

20. Добавляют NPY(3-36) и осторожно перемешивают до растворения.

21. Проверяют pH, чтобы удостовериться в том, что его величина равна $5,0 \pm 0,25$. Добавляют разбавленную HCl или разбавленный NaOH для доведения pH.

22. Добавляют воду до конечного объема.

Таблица 12

Реагент	Марка	Поставщик	мг/мл	%
Хлорбутанол, безводный	NF	Spectrum	5,0	0,50
Метил-β-Циклодекстрин		Sigma	45	4,5
L-α-Фосфатидилхолиндидеканоил		Sigma	1	0,1
Двухосновный эдетат натрия	USP	Dow Chemicals	1	0,1
Дигидрат цитрата натрия	USP	Spectrum	1,62	0,162
Лимонная кислота, безводная	USP	Sigma	0,86	0,086
α -Лактозы моногидрат		Sigma	9	0,9
Сорбит		Sigma	18,2	1,82
NPY(3-36)	GMP	Bachem	1	0,1
Очищенная вода				

pH препарата: $5 \pm 0,25$

Осмолярность ~250

Пример 29.

Второй препарат получают, как указано выше, за исключение того, что концентрация NPY(3-36) составляет 15 мг/мл, как показано ниже в табл. 13.

Таблица 13

Реагент	Марка	Поставщик	мг/мл	%
Хлорбутанол, безводный	NF	Spectrum	5,0	0,50
Метил-β-циклодекстрин		Sigma	45	4,5
L- α -Фосфатидилхолиндидеканоил		Sigma	1	0,1
Двухосновный эдетат натрия	USP	Dow Chemicals	1	0,1
Дигидрат цитрата натрия	USP	Spectrum	1,62	0,162
Лимонная кислота, безводная	USP	Sigma	0,86	0,086
α -Лактоза моногидрат		Sigma	9	0,9
Сорбит		Sigma	18,2	1,82
NPY(3-36)	GMP	Bachem	15	0,1
Очищенная вода				

pH препарата: $5 \pm 0,25$

Пример 30. Получение препарата панкреатического пептида (PP), не содержащего стабилизатор, являющийся белком.

Препарат РУУ, подходящий для интраназального введения PP, по существу, не содержащий стабилизатор, являющийся белком, получают при наличии препаратов, перечисленных ниже.

23. Около % воды добавляют в химический стакан и перемешивают на магнитной мешалке и добавляют цитрат натрия до полного растворения.

24. Затем добавляют ЭДТА и перемешивают до полного растворения.

25. Затем добавляют лимонную кислоту и перемешивают до полного растворения.
26. Добавляют метил-β-циклодекстрин и перемешивают до полного растворения.
27. Затем добавляют DDPC и перемешивают до полного растворения.
28. Затем добавляют лактозу и перемешивают до полного растворения.
29. Затем добавляют сорбит и перемешивают до полного растворения.
30. Затем добавляют хлорбутанол и перемешивают до полного растворения.
31. Добавляют PP(3-36) и осторожно перемешивают до растворения.
32. Проверяют pH, чтобы убедиться в том, что его величина составляет $5,0 \pm 0,25$. Добавляют разбавленную HCl или разбавленный NaOH для доведения pH.
33. Добавляют воду до конечного объема.

Таблица 14

Реагент	Марка	Поставщик	мг/мл	%
Хлорбутанол, безводный	NF	Spectrum	5,0	0,50
Метил-β-Циклодекстрин		Sigma	45	4,5
L- α -Фосфатидилхолиндидеканоил		Sigma	1	0,1
Двухосновный эдетат натрия	USP	Dow Chemicals	1	0,1
Дигидрат цитрата натрия	USP	Spectrum	1,62	0,162
Лимонная кислота, безводная	USP	Sigma	0,86	0,086
α -Лактозы моногидрат		Sigma	9	0,9
Сорбит		Sigma	18,2	1,82
PP(3-36)	GMP	Bachem	1	0,1
Очищенная вода				

pH препарата: $5 \pm 0,25$

Осмолярность ~250

Пример 31.

Второй препарат получают, как указано выше, за исключением того, что концентрация PP(3-36) составляет 15 мг/мл, как показано ниже в табл. 15.

Таблица 15

Реагент	Марка	Поставщик	мг/мл	%
Хлорбутанол, безводный	NF	Spectrum	5,0	0,50
Метил-β-циклодекстрин		Sigma	45	4,5
L- α -Фосфатидилхолиндидеканоил		Sigma	1	0,1
Двухосновный эдетат натрия	USP	Dow Chemicals	1	0,1
Дигидрат цитрата натрия	USP	Spectrum	1,62	0,162
Лимонная кислота, безводная	USP	Sigma	0,86	0,086
α -Лактозы моногидрат		Sigma	9	0,9
Сорбит		Sigma	18,2	1,82
PP(3-36)	GMP	Bachem	15	0,1
Очищенная вода				

pH препарата: $5 \pm 0,25$

Хотя вышеуказанное изобретение было описано в деталях с приведением примера в целях ясного понимания, специалисту должно быть понятно, что это описание подразумевает определенные измене-

ния и модификации, и их можно осуществлять без излишнего экспериментирования в объеме прилагаемой формулы, которая дана для иллюстрации, но не ограничения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение пептида РУУ(3-36) для изготовления медикамента для лечения ожирения или контроля потребления пищи у пациента, причем введение через слизистые оболочки по меньшей мере 50 мкг указанного пептида в указанном медикаменте повышает концентрацию указанного пептида в плазме субъекта по меньшей мере на 5 пмоль/л.
2. Применение по п.1, причем введение медикамента вызывает чувство сытости.
3. Применение по п.1, причем введение медикамента вызывает потерю чувства голода.
4. Применение по п.1, причем введение медикамента вызывает потерю аппетита.
5. Применение по п.1, причем введение медикамента осуществляется перорально.
6. Применение по п.1, причем введение медикамента осуществляется защечно.
7. Применение по п.1, причем введение медикамента осуществляется интраназально.
8. Применение по п.1, причем введение медикамента снижает потребление пищи.
9. Применение по п.1, причем введение медикамента способствует потере веса.
10. Применение по п.1, причем введение медикамента лечит ожирение.
11. Применение по п.1, причем введение медикамента предотвращает начало или развитие ожирения.
12. Применение по п.1, причем введение медикамента лечит диабет.
13. Применение по п.7, причем интраназально вводят приблизительно от 50 до 200 мкл медикамента.
14. Применение по п.13, причем вводят приблизительно 3-10 мкг пептида на килограмм массы тела.
15. Применение по п.13, причем вводят приблизительно от 50 до 800 мкг пептида.
16. Применение пептида РУУ(3-36) для изготовления медикамента для лечения ожирения, причем время до достижения максимальной концентрации в плазме T_{max} для указанного пептида после введения указанного медикамента млекопитающему через слизистые оболочки составляет менее 30 мин.
17. Применение по п.16, причем T_{max} составляет около 20 мин.
18. Применение по п.16, причем при введении через слизистые оболочки время полувыведения указанного пептида составляет приблизительно 55 мин.
19. Применение пептида РУУ(3-36) для изготовления медикамента для лечения ожирения у млекопитающих, причем однократное введение через слизистые оболочки указанного медикамента приводит к величине C_{max} более 300 пг/мл.
20. Применение по п.19, причем величина C_{max} больше 75 пмоль/л.
21. Применение пептида РУУ(3-36) для изготовления медикамента для лечения ожирения у млекопитающих, причем воздействие указанного медикамента на слой эпителиальных клеток слизистой оболочки снижает электрическое сопротивление через этот слой по меньшей мере в 100 раз.
22. Применение по п.21, причем указанный слой эпителиальных клеток слизистой оболочки представляет собой монослой бронхиальных клеток.
23. Применение пептида РУУ(3-36) для изготовления медикамента для лечения ожирения у млекопитающих, причем воздействие указанного медикамента на слой эпителиальных клеток слизистой оболочки увеличивает прохождение пептида через этот слой по меньшей мере в 30 раз по сравнению с простыми буферными растворами.
24. Применение по п.23, причем указанный слой эпителиальных клеток слизистой оболочки представляет собой монослой бронхиальных клеток.
25. Применение пептида РУУ(3-36) для изготовления медикамента для лечения ожирения у млекопитающих, причем введение через слизистые оболочки указанного медикамента повышает концентрации указанного пептида в плазме, не вызывая неблагоприятных побочных эффектов, таких как тошнота или головокружение.
26. Применение пептида РУУ(3-36) для изготовления медикамента для лечения ожирения у млекопитающих, причем медикамент состоит из солюбилизирующего агента, хелатирующего агента, одного или более полиолов и указанного пептида РУУ.
27. Применение по п.26, причем медикамент дополнительно содержит поверхностно-активный агент.
28. Применение по п.26, причем солюбилизирующий агент представляет собой метил- β -циклодекстрин.
29. Применение по п.27, причем поверхностно-активный агент представляет собой L- α -фосфатидилхолин дидеканоил (DDPC).
30. Применение пептида РУУ для изготовления медикамента для лечения ожирения у пациента, причем медикамент состоит из солюбилизирующего агента, хелатирующего агента, полиола и пептида

PYY, причем пептид PYY имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, включающей последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и SEQ ID NO: 90-105.

31. Применение по п.30, причем медикамент содержит по крайней мере два полиола.
32. Применение по п.31, причем полиолы выбирают из группы, включающей сахарозу, маннит, сорбит, лактозу, L-арабинозу, D-эритрозу, D-рибозу, D-ксилозу, D-маннозу, трегалозу, D-галактозу, лактулозу, целлобиозу, гентибиозу, глицерин и полиэтиленгликоль.
33. Применение по п.32, причем полиолы представляют собой лактозу и сорбит.
34. Применение по п.30, причем хелатирующий агент представляет собой этилендиамин тетрауксусную кислоту (ЭДТА) или этиленгликоль тетрауксусную кислоту (ЭГТА).
35. Применение по п.34, причем хелатирующий агент представляет собой ЭДТА.
36. Применение по п.30, причем солюбилизирующий агент выбирают из группы, включающей циклодекстран, гидроксипропил-β-циклодекстран, сульфобутиловый эфир β-циклодекстрана и метил-β-циклодекстрин.
37. Применение по п.36, причем солюбилизирующим агентом является циклодекстрин.
38. Применение по п.30, причем композиция дополнительно содержит поверхностно-активный агент.
39. Применение по п.38, причем поверхностно-активный агент выбирают из группы, включающей неионный полиоксиэтиленовый эфир, соли желчных кислот, такие как гликохолат натрия (SGC), деоксихолат (DOC), производные фусидовой кислоты, тауродигидрофусидат натрия (STDHF), L-α-фосфатидилхолин дидеканоил (DDPC), полисорбат 80 и полисорбат 20, полиэтиленгликоль (ПЭГ), цетиловый спирт, поливинилпирролидон (PVP), поливиниловый спирт (PVA), ланолиновый спирт и сорбитан моноолеат.
40. Применение по п.39, причем поверхностно-активный агент представляет собой DDPC.
41. Применение по п.30, причем композиция является водной композицией PYY, дополнительно включающей воду.
42. Применение по п.41, причем pH водной композиции PYY составляет приблизительно от 3 до 6.
43. Применение по п.42, причем pH водной композиции PYY составляет $5,0 \pm 0,3$.
44. Применение по п.30, причем пептид PYY имеет последовательность PYY (3-36) (SEQ ID NO: 2).
45. Применение пептида PYY для изготовления медикамента для лечения ожирения у пациента, причем медикамент содержит пептид PYY и одно или более веществ из группы, включающей полиол, солюбилизирующий агент и хелатирующий агент, причем пептид PYY имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, включающей последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и SEQ ID NO: 90-105.
46. Применение по п.45, причем введение медикамента вызывает чувство сытости.
47. Применение по п.45, причем введение медикамента вызывает потерю чувства голода.
48. Применение по п.45, причем введение медикамента вызывает потерю аппетита.
49. Применение по п.45, причем введение медикамента осуществляется перорально.
50. Применение по п.45, причем введение медикамента осуществляется защежно.
51. Применение по п.45, причем введение медикамента осуществляется интраназально.
52. Применение по п.45, причем введение медикамента снижает потребление пищи.
53. Применение по п.45, причем введение медикамента способствует потере веса.
54. Применение по п.45, причем введение медикамента лечит ожирение.
55. Применение по п.45, причем введение медикамента предотвращает начало или развитие ожирения.
56. Применение по п.45, причем введение медикамента лечит диабет.
57. Препарат пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, для доставки через слизистые оболочки, способный повышать концентрацию пептида, связывающегося с Y2-рецепторами, в плазме млекопитающего по меньшей мере на 5 пмоль в 1 л плазмы или более при введении указанному млекопитающему через слизистые оболочки дозы, содержащей по меньшей мере 50 мкг агониста, связывающегося с Y2-рецепторами.
58. Препарат по п.57, причем пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, выбирают из группы, включающей пептид YY (PYY), нейропептид Y (NPY) и панкреатический пептид (PP).
59. Препарат по пп.57 и 58, содержащий также по крайней мере один агент, способствующий доставке через слизистые оболочки, выбираемый из группы, включающей:
 - a) солюбилизирующий агент;
 - b) агент, модифицирующий заряд;
 - c) агент, контролирующий pH;
 - d) агент, ингибирующий разлагающий фермент;
 - e) агент, являющийся муколитическим или удаляющим слизь;
 - f) цилиостатический агент;

g) агент, способствующий проникновению через мембраны, выбираемый из (i) поверхностно-активного агента, (ii) соли желчной кислоты, (iii) фосфолипидной добавки, смешанной мицеллы, липосомы или носителя, (iv) спирта, (v) енамина, (vi) соединения, являющегося донором NO, (vii) длинноцепочечной амфипатической молекулы, (viii) малого гидрофобного агента, способствующего проникновению, (ix) производного натрия или салициловой кислоты, (x) сложного эфира глицерина и ацетоксусной кислоты, (xi) производного циклодекстрина или бета-циклодекстрина, (xii) жирной кислоты с цепью средней длины, (xiii) хелатирующего агента, (xiv) аминокислоты или ее соли, (xv) N-ацетиламинокислоты или ее соли, (xvi) фермента, разлагающего избранный компонент мембраны, (xvii) ингибитора синтеза жирных кислот, или (xviii) ингибитора синтеза холестерина или (xix) любой комбинации агентов, способствующих проникновению через мембраны по (i)-(xix);

h) агент, модулирующий физиологию эпителиальных стыков;

i) агент, являющийся вазодилататором;

j) агент, способствующий селективному транспорту; и

k) стабилизирующее средство доставки, носитель, основу или комплексообразователь.

60. Препарат по п.57, причем препарат является интраназальным.

61. Препарат по пп.57-60, причем препарат дополнительно содержит по крайней мере два полиола.

62. Препарат по п.61, причем полиолы представляют собой лактозу и сорбит.

63. Препарат по пп.57-62, причем препарат дополнительно содержит хелатирующий агент.

64. Препарат по п.63, причем хелатирующий агент представляет собой этилендиамин тетрауксусную кислоту (ЭДТА).

65. Препарат по пп.57-64, причем препарат дополнительно содержит солюбилизирующий агент.

66. Препарат по п.65, причем солюбилизирующий агент представляет собой циклодекстрин.

67. Препарат по пп.57-66, причем препарат дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

68. Препарат по п.67, причем поверхностно-активное вещество представляет собой L- α -фосфатидилхолин дидеканоил (DDPC).

69. Препарат по п.57, причем пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, представляет собой PYY (3-36).

70. Препарат по п.68, причем препарат дополнительно содержит воду.

71. Препарат по п.69, причем pH препарата составляет приблизительно от 3 до 6.

72. Препарат по п.70, причем pH составляет $5,0 \pm 0,3$.

73. Композиция пептида YY (PYY), содержащая солюбилизирующий агент, хелатирующий агент, полиол и пептид PYY, причем пептид PYY имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, включающей последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и SEQ ID NO: 90-105.

74. Композиция PYY по п.73, причем композиция PYY содержит по крайней мере два полиола.

75. Композиция PYY по п.73, причем полиолы выбирают из группы, включающей сахарозу, маннит, сорбит, лактозу, L-арабинозу, D-эритрозу, D-рибозу, D-ксилозу, D-маннозу, трегалозу, D-галактозу, лактулозу, целлобиозу, гентибиозу, глицерин и полиэтиленгликоль.

76. Композиция PYY по п.74, причем полиолы представляют собой лактозу и сорбит.

77. Композиция PYY по п.73, причем хелатирующий агент представляет собой этилендиамин тетрауксусную кислоту (ЭДТА) или этиленгликоль тетрауксусную кислоту (ЭГТА).

78. Композиция PYY по п.77, причем хелатирующий агент представляет собой ЭДТА.

79. Композиция PYY по п.73, причем солюбилизирующий агент выбирают из группы, включающей циклодекстран, гидроксипропил- β -циклодекстран, сульфобутиловый эфир β -циклодекстрана и метил- β -циклодекстрин.

80. Композиция PYY по п.78, причем солюбилизирующий агент представляет собой циклодекстрин.

81. Композиция PYY по п.73, причем композиция дополнительно содержит поверхностно-активный агент.

82. Композиция PYY по п.80, причем поверхностно-активный агент выбирают из группы, включающей неионный полиоксипропиловый эфир, соли желчной кислоты, такие как гликохолат натрия (SGC), деоксихолат (DOC), производные фусидовой кислоты, тауродициклофосфат натрия (STDHF), L- α -фосфатидилхолин дидеканоил (DDPC), полисорбат 80 и полисорбат 20, полиэтиленгликоль (ПЭГ), цетиловый спирт, поливинилпирролидон (PVP), поливиниловый спирт (PVA), ланолиновый спирт и сорбитан моноолеат.

83. Композиция PYY по п.81, причем поверхностно-активный агент представляет собой DDPC.

84. Композиция PYY по п.73, причем композиция является водной композицией PYY, дополнительно содержащей воду.

85. Композиция PYY по п.83, причем pH водной композиции составляет приблизительно от 3 до 6.

86. Композиция PYY по п.85, причем pH водной композиции PYY составляет $5,0 \pm 0,3$.

87. Композиция PYY по п.73, причем пептид PYY содержит PYY(3-36) (SEQ ID NO: 2).

88. Композиция РУУ, содержащая метил-β-циклодекстрин, ЭДТА, лактозу, сорбит, DDPC и пептид РУУ, причем пептид РУУ имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, включающей последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и SEQ ID NO: 90-105.

89. Композиция РУУ по п.88, причем пептид РУУ содержит РУУ(3-36) (SEQ ID NO: 2).

90. Водный препарат РУУ(3-36), способный повышать концентрацию РУУ(3-36) в плазме пациента по крайней мере на 5 пмоль в 1 л плазмы при введении указанному млекопитающему через слизистые оболочки дозы, содержащей по крайней мере 50 мкг РУУ(3-36).

91. Препарат РУУ(3-36) по п.90, причем указанному пациенту вводят интраназально приблизительно от 50 до 200 мкл препарата.

92. Водный препарат РУУ(3-36), содержащий РУУ(3-36) и солюбилизирующий агент, причем препарат, по существу, свободен от стабилизатора, являющегося полипептидом или белком.

93. Препарат РУУ(3-36) по п.91, причем препарат дополнительно содержит хелатирующий агент, один или более полиолов и имеет pH приблизительно от 3 до 6,5.

94. Препарат РУУ(3-36) по п.92, причем препарат дополнительно содержит поверхностно-активный агент.

95. Препарат РУУ(3-36) по п.93, причем pH препарата составляет приблизительно 5,0.

96. Препарат РУУ(3-36) по п.93, причем препарат не содержит эндотоксин.

97. Препарат РУУ(3-36) по п.92, причем препарат содержит по крайней мере два полиола.

98. Препарат РУУ(3-36) по п.96, причем полиолы выбирают из группы, включающей сахарозу, маннит, сорбит, лактозу, L-арабинозу, D-эритрозу, D-рибозу, D-ксилозу, D-маннозу, трегалозу, D-галактозу, лактулозу, целлобиозу, гентибиозу, глицерин и полиэтиленгликоль.

99. Препарат РУУ(3-36) по п.97, причем полиолы представляют собой лактозу и сорбит.

100. Препарат РУУ(3-36) по п.92, причем хелатирующий агент представляет собой этилендиамин тетрауксусную кислоту (ЭДТА) или этиленгликоль тетрауксусную кислоту (ЭГТА).

101. Препарат РУУ(3-36) по п.100, причем хелатирующий агент представляет собой ЭДТА.

102. Препарат РУУ(3-36) по п.92, причем солюбилизирующий агент выбирают из группы, включающей циклодекстран, гидроксипропил-β-циклодекстран, сульфобутиловый эфир β-циклодекстрана и метил-β-циклодекстрин.

103. Препарат РУУ(3-36) по п.101, причем солюбилизирующим агентом является циклодекстрин.

104. Препарат РУУ(3-36) по п.92, причем поверхностно-активный агент выбирают из группы, включающей неионный полиоксипропиленовый эфир, соли желчной кислоты, такие как гликохолат натрия (SGC), деоксихолат (DOC), производные фусидовой кислоты, тауродициклофосфид натрия (STDHF), L-α-фосфатидилхолин дидеканоил (DDPC), полисорбат 80 и полисорбат 20, полиэтиленгликоль (ПЭГ), цетиловый спирт, поливинилпирролидон (PVP), поливиниловый спирт (PVA), ланолиновый спирт и сорбитан моноолеат.

105. Препарат РУУ(3-36) по п.103, причем поверхностно-активный агент представляет собой DDPC.

106. Препарат РУУ(3-36) по п.92, причем препарат дополнительно содержит консервант, выбираемый из группы, включающей хлорбутанол и бензалкония хлорид.

107. Препарат РУУ(3-36) по п.105, причем консервант представляет собой хлорбутанол.

108. Препарат РУУ(3-36) по п.103 или 107, причем интраназально вводят приблизительно от 50 до 200 мкл препарата.

109. Препарат РУУ(3-36) по п.92, причем время достижения максимальной концентрации в плазме после введения указанного препарата через слизистые оболочки T_{max} для указанного пептида составляет менее 30 мин.

110. Препарат РУУ(3-36) по п.109, причем T_{max} составляет приблизительно 20 мин.

111. Препарат РУУ(3-36) по п.109, причем введение указанного препарата через слизистые оболочки повышает концентрацию указанного пептида в плазме, период полувыведения пептида составляет около 55 мин.

112. Водный препарат РУУ(3-36), содержащий пептид РУУ(3-36), причем однократное введение указанного препарата через слизистые оболочки приводит к величине C_{max} более 300 пг/мл.

113. Препарат РУУ(3-36) по п.112, причем величина C_{max} больше 75 пмоль/л.

114. Препарат РУУ(3-36) по п.112, причем взаимодействие слоя эпителиальных клеток слизистой оболочки с указанным препаратом снижает электрическое сопротивление через указанный слой по крайней мере в 100 раз.

115. Препарат РУУ(3-36) по п.114, причем указанный слой эпителиальных клеток слизистой оболочки представляет собой монослой бронхиальных клеток.

116. Препарат РУУ(3-36) по п.112, причем взаимодействие слоя эпителиальных клеток слизистой оболочки с указанным препаратом повышает прохождение пептида через указанный слой по крайней мере в 30 раз по сравнению с простыми буферными растворами.

117. Препарат РУУ(3-36) по п.116, причем прохождение пептида через указанный слой по крайней мере в 100 раз выше по сравнению с простыми буферными растворами.

118. Препарат РУУ(3-36) по п.117, причем указанный слой эпителиальных клеток слизистой оболочки представляет собой монослой бронхиальных клеток.

119. Препарат РУУ(3-36) по п.112, причем стабильность пептида в препарате составляет по крайней мере 96% в течение одного месяца при температуре 5 или 25°C.

120. Композиция пептида УУ (РУУ), содержащая пептид РУУ и стабилизатор, отличный от полипептида или белка, причем пептид РУУ имеет аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, включающей последовательности SEQ ID NO: 2, 3 и SEQ ID NO: 90-105.

121. Препарат РУУ(3-36), содержащий воду, пептид, связывающийся с Y2-рецепторами, один или более полиолов и поверхностно-активный агент, причем pH препарата составляет приблизительно от 3,0 до 6,5 и препарат, по существу, свободен от стабилизатора, являющегося полипептидом или белком.

122. Препарат по п.121, причем полиол выбирают из группы, включающей лактозу, сорбит, трегалозу, сахарозу, маннозу и мальтозу и их производные и гомологи.

123. Препарат РУУ(3-36) по п.121, причем поверхностно-активный агент выбирают из группы, включающей неионный полиоксэтиленовый эфир, соли желчных кислот, такие как гликохолат натрия (SGC), деоксихолат (DOC), производные фусидовой кислоты, тауродигидрофусидат натрия (STDHF), L- α -фосфатидилхолин дидеканоил (DDPC), полисорбат 80 и полисорбат 20, полиэтиленгликоль (ПЭГ), цетиловый спирт, поливинилпирролидон (PVP), поливиниловый спирт (PVA), ланолиновый спирт и сорбитан моноолеат.

124. Препарат РУУ(3-36) по пп.121 и 122, причем препарат дополнительно содержит солилизующий агент и хелатирующий агент.

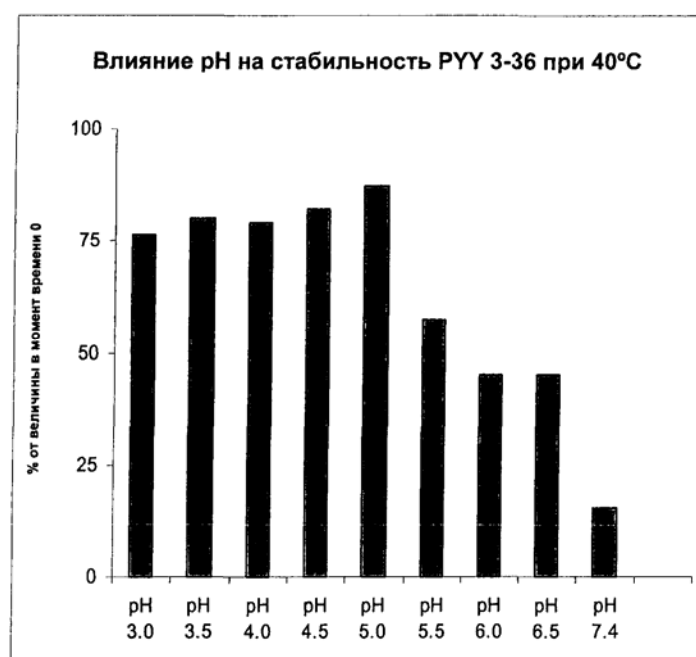
125. Препарат РУУ(3-36) по п.123, причем солилизующий агент выбирают из группы, включающей циклодекстран, гидроксипропил- β -циклодекстран, сульфобутиловый эфир β -циклодекстрана и метил- β -циклодекстрин.

126. Композиция РУУ, содержащая воду, цитрат натрия, лимонную кислоту, метил- β -циклодекстрин, ЭДТА, лактозу, сорбит, DDPC и РУУ(3-36) (SEQ ID NO: 2), причем pH препарата составляет приблизительно $5,0 \pm 0,3$.

127. Композиция РУУ по п.126, дополнительно содержащая консервант, выбираемый из группы, включающей хлорбутанол и бензалкония хлорид.

128. Композиция по п.17, причем консервант представляет собой хлорбутанол.

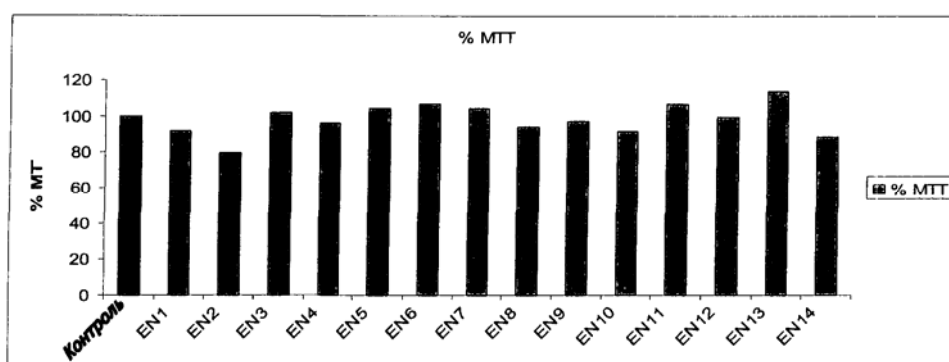
129. Композиция РУУ, содержащая воду, хлорбутанол, цитрат натрия, лимонную кислоту, метил- β -циклодекстрин, ЭДТА, лактозу, сорбит, DDPC и РУУ(3-36) (SEQ ID NO: 2), причем pH препарата составляет приблизительно $5,0 \pm 0,3$.



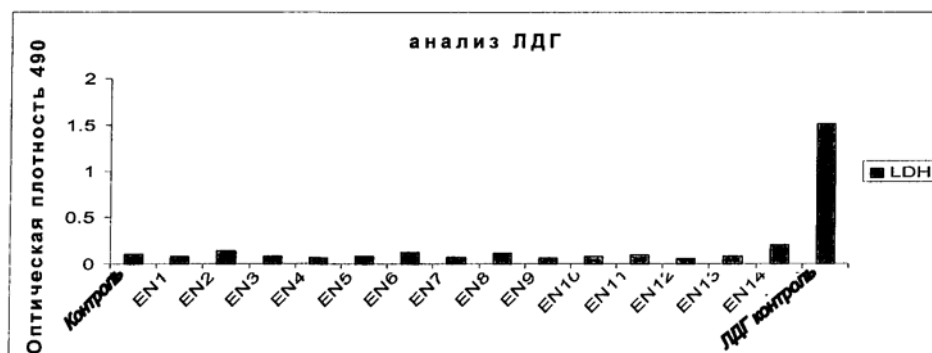
Фиг. 1



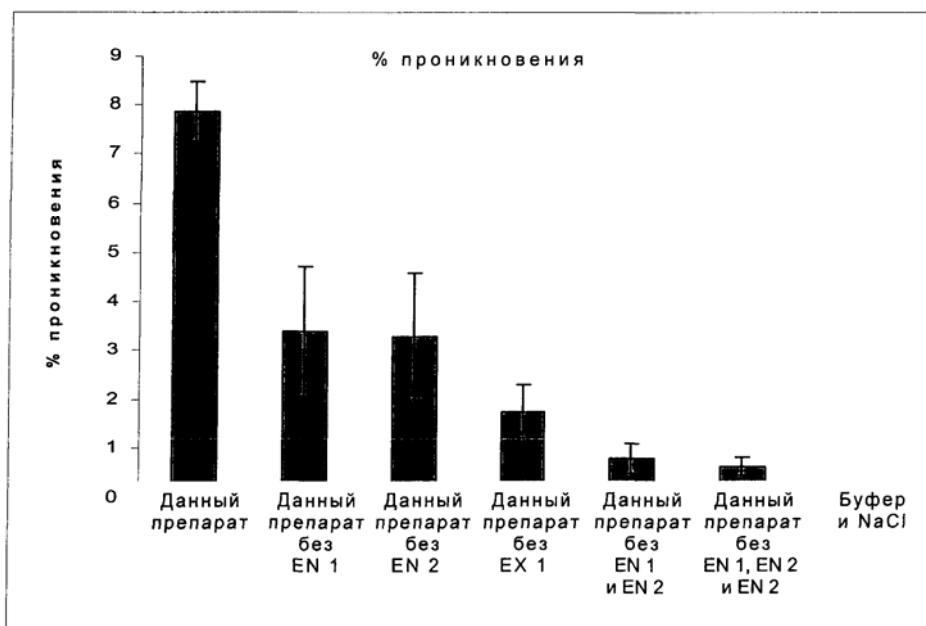
Фиг. 2



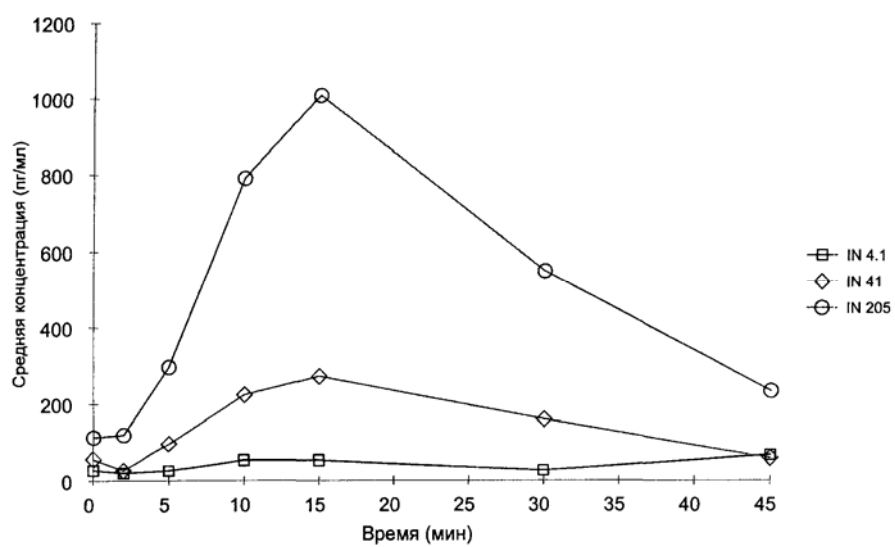
Фиг. 3



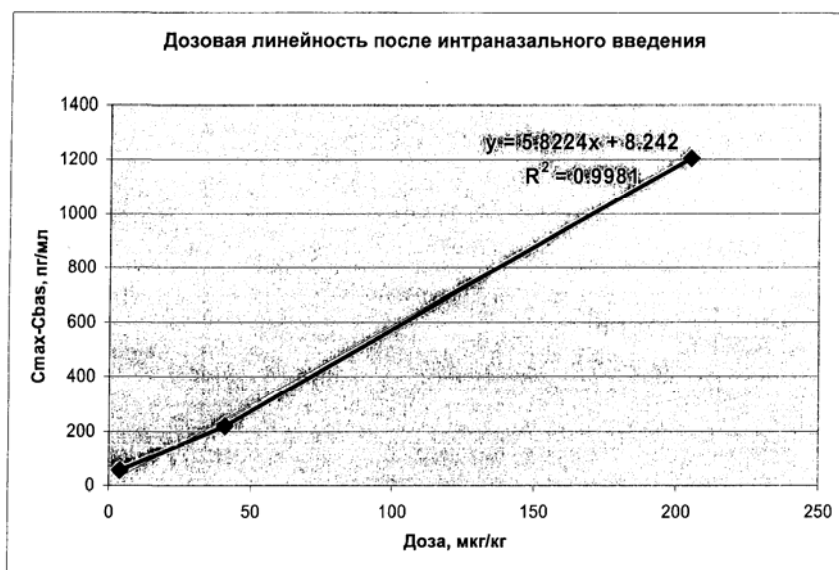
Фиг. 4



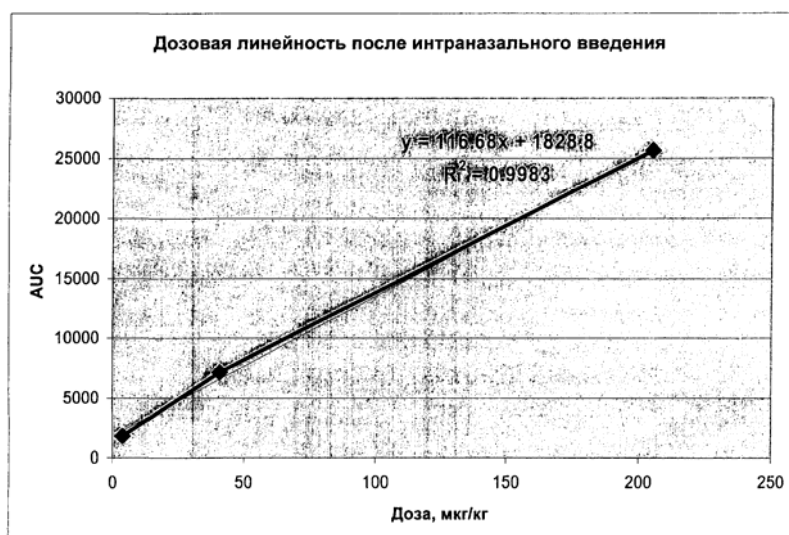
Фиг. 5



Фиг. 6

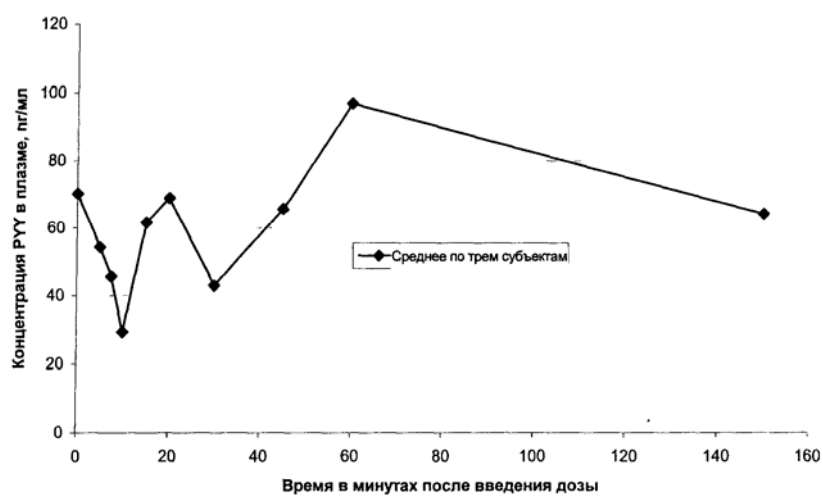


Фиг. 7

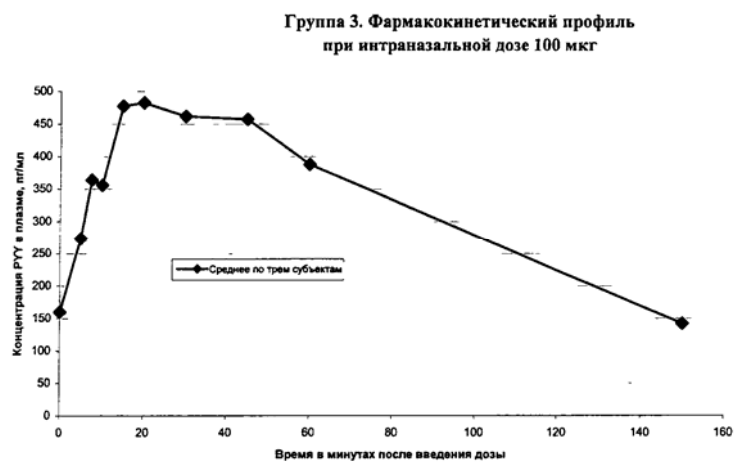
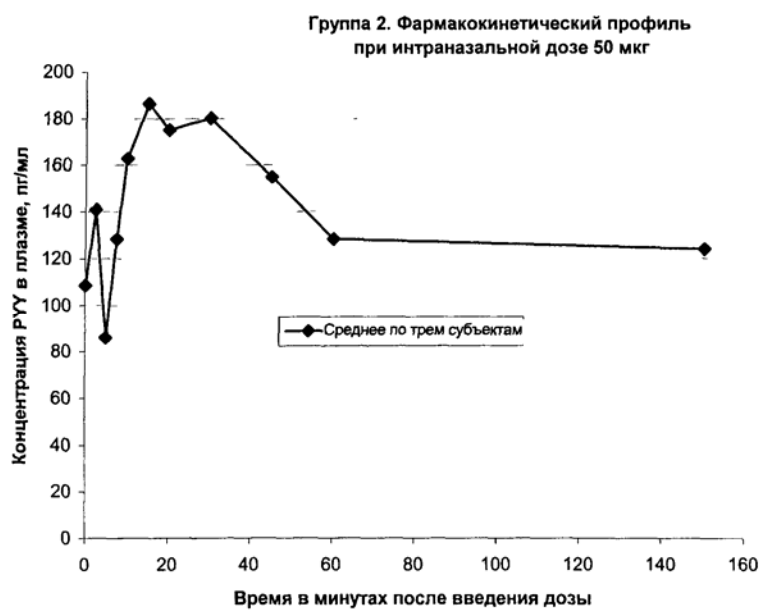


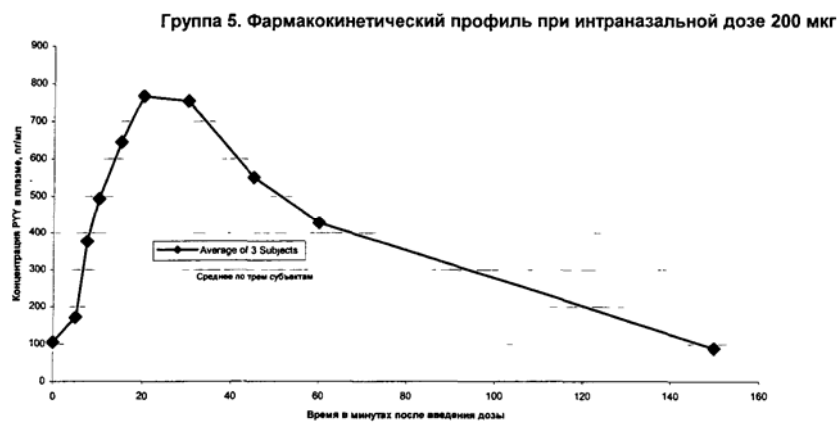
Фиг. 8

Группа 1. Фармакокинетический профиль
при интраназальной дозе 20 мкг

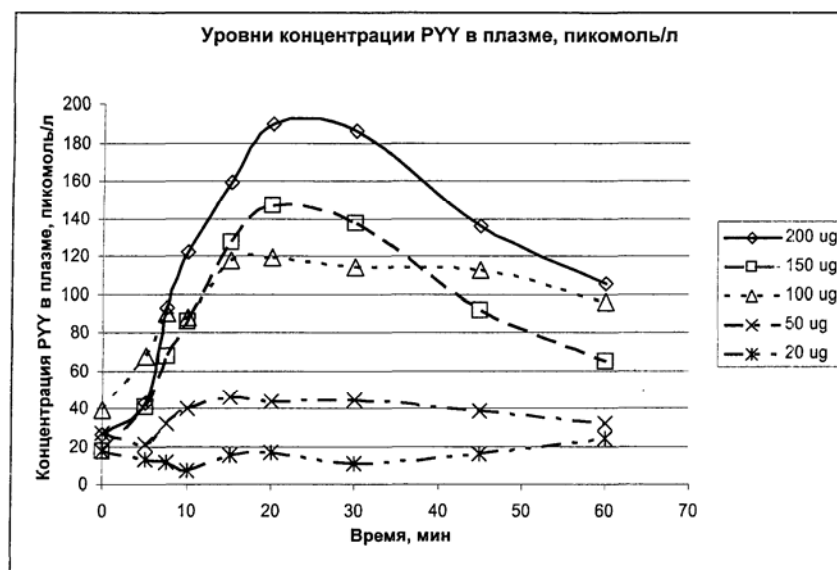


Фиг. 9

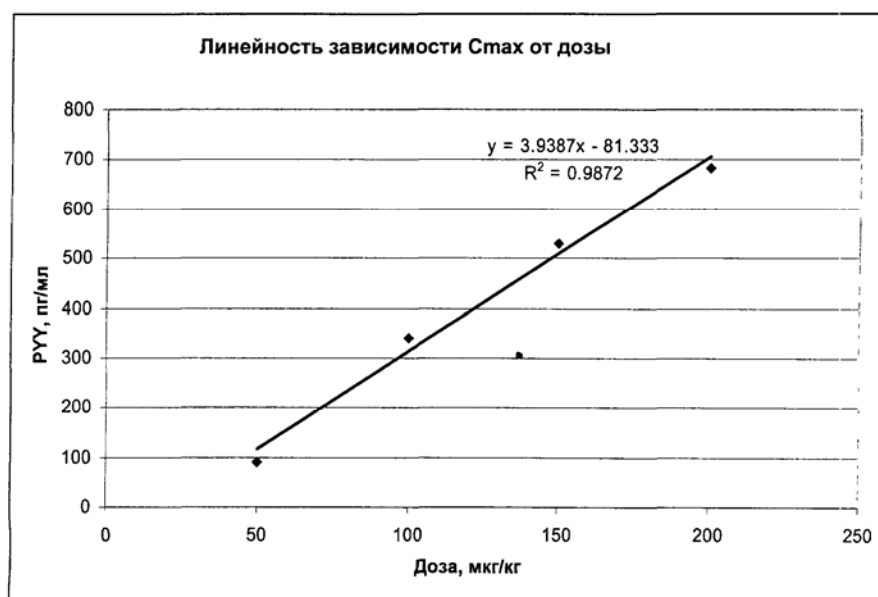




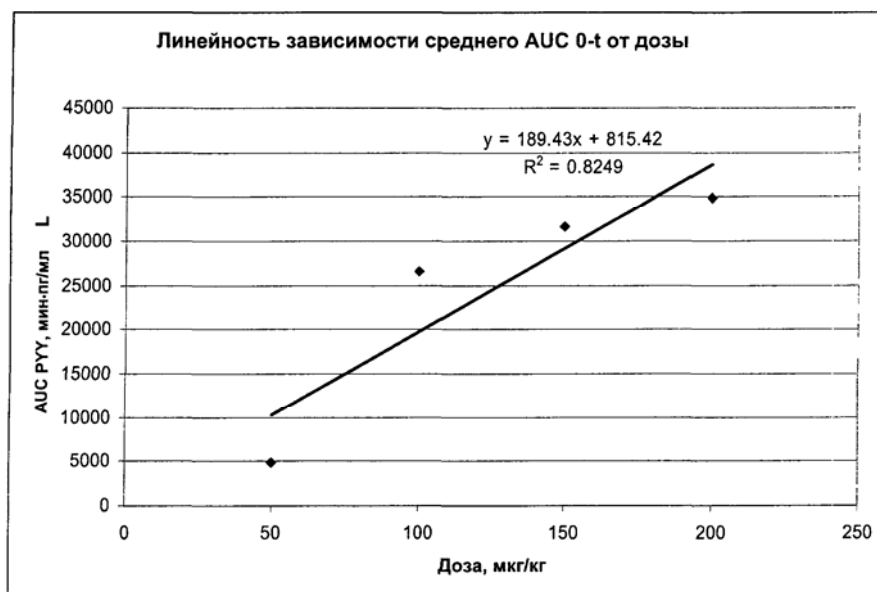
Фиг. 13



Фиг. 14

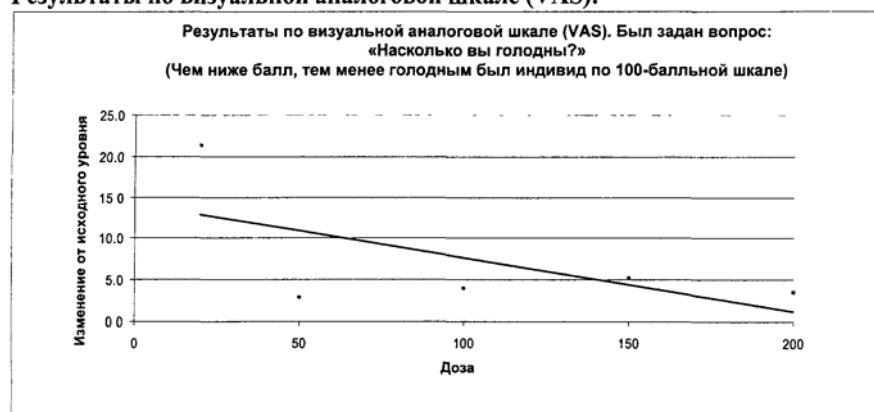


Фиг. 15

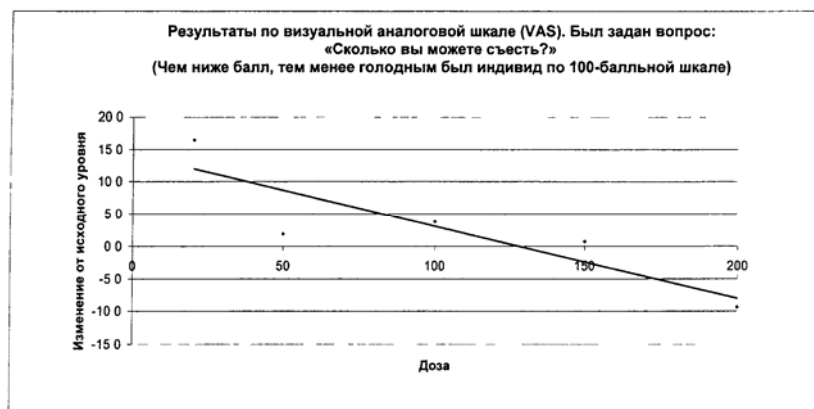


Фиг. 16

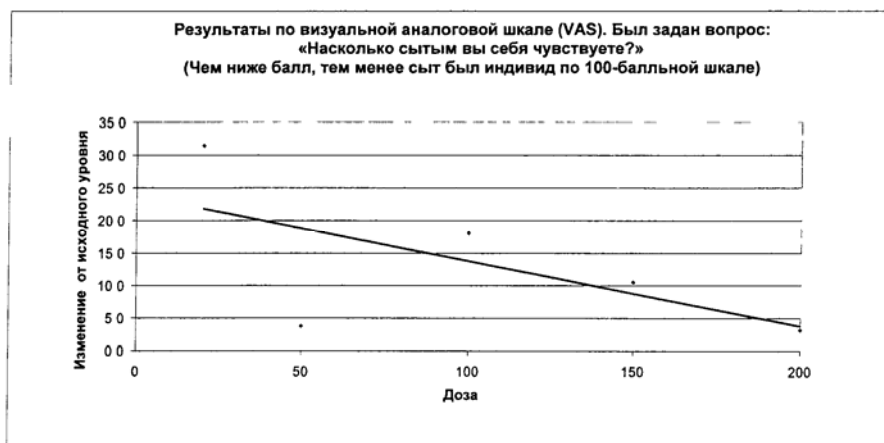
Результаты по визуальной аналоговой шкале (VAS):



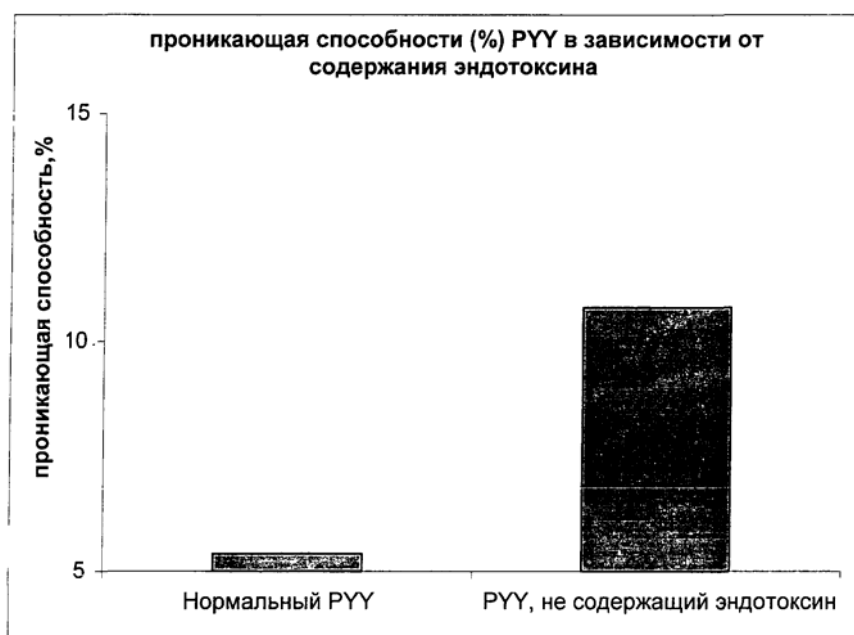
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Nastech Pharmaceutical Company Inc.
 Quay, Steven C.
 Brandt, Gordon
 Kleppe, Mary S.
 MacEvilly, Conor J.

<120> КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ УСОВЕРШЕНСТВОВАННОЙ ДОСТАВКИ
 ПЕПТИДОВ, СВЯЗЫВАЮЩИХСЯ С Y2-РЕЦЕПТОРАМИ,
 КОТОРУЮ ОСУЩЕСТВЛЯЮТ ЧЕРЕЗ СЛИЗИСТЫЕ ОБОЛОЧКИ,
 И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ОЖИРЕНИЯ

<130> 02-04 PCT

<150> US 60/518,812

<151> 2003-11-10

<150> US 10/322,266

<151> 2002-12-17

<150> US 60/493,226

<151> 2003-08-07

<150> US 60/501,170

<151> 2003-09-08

<150> US 60/510,785

<151> 2003-10-10

<150> US 60/517,290

<151> 2003-11-04

<160> 105

<170> FastSEQ for windows Version 4.0

<210> 1

<211> 36

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Pro Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
 1 5 10 15

Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
 20 25 30

Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 2

<211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
 1 5 10 15
 Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 20 25 30
 Arg Tyr

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg
 20 25 30
 Tyr

<210> 5
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25 30

<210> 6

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25 30

<210> 7
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25 30

<210> 8
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser
 1 5 10 15
 Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25

<210> 9
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu
 1 5 10 15
 Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25

<210> 10
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg
 1 5 10 15

His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25

<210> 11

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His
 1 5 10 15

Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25

<210> 12

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr
 1 5 10 15

Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu
 1 5 10 15

Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20

<210> 14

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
20

<210> 15
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu
1 5 10 15

Val Thr Arg Gln Arg Tyr
20

<210> 16
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val
1 5 10 15

Thr Arg Gln Arg Tyr
20

<210> 17
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr
20

<210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg
1 5 10 15

Gln Arg Tyr

<210> 19
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 1 5 10 15

Arg Tyr

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg
 1 5 10 15

Tyr

<210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp
 1 5 10 15

Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr
 20 25 30

Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 23
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
1 5 10

<210> 24

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala
1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln
20 25 30

Arg Tyr

<210> 25

<211> 33

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg
1 5 10 15

Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg
20 25 30

Tyr

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr
1 5 10 15

Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
20 25 30

<210> 27

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr Tyr
1 5 10 15

Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
20 25 30

<210> 28

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr Tyr Ser
1 5 10 15

Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
20 25 30

<210> 29

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala
1 5 10 15

Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
20 25

<210> 30

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu
1 5 10 15

Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
20 25

<210> 31

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg

1 5 10 15
 His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25

<210> 32
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Asp Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His
 1 5 10 15

Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25

<210> 33
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Ala Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr
 1 5 10 15

Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25

<210> 34
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Pro Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile
 1 5 10 15

Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 20

<210> 35
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn
 1 5 10 15

Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 20

<210> 36
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Glu Asp Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu
 1 5 10 15
 Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 20

<210> 37
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 Asp Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile
 1 5 10 15
 Thr Arg Gln Arg Tyr
 20

<210> 38
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Tyr
 20

<210> 39
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg
 1 5 10 15
 Gln Arg Tyr

<210> 40
 <211> 18

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln
 1 5 10 15
 Arg Tyr

<210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg
 1 5 10 15
 Tyr

<210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 1 5 10 15

<210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 1 5 10

<210> 45

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 1 5 10

<210> 46
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr
 1 5 10

<210> 47
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 Ala Ser Leu Glu Pro Glu Tyr Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr
 20 25 30
 Arg Pro Arg Tyr
 35

<210> 48
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
 1 5 10

<210> 49
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 Leu Glu Pro Glu Tyr Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln Met Ala
 1 5 10 15
 Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 50
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 Glu Pro Glu Tyr Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln Met Ala Gln
 1 5 10 15
 Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg
 20 25 30

Tyr

<210> 51
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 Pro Glu Tyr Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln Met Ala Gln Tyr
 1 5 10 15
 Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
 20 25 30

<210> 52
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52
 Glu Tyr Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln Met Ala Gln Tyr Ala
 1 5 10 15
 Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
 20 25 30

<210> 53
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 Tyr Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln Met Ala Gln Tyr Ala Ala
 1 5 10 15

Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
 20 25 30

<210> 54
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
 20 25

<210> 55
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu
 1 5 10 15

Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
 20 25

<210> 56
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56
 Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg
 1 5 10 15

Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
 20 25

<210> 57
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 57
 Asn Ala Thr Pro Glu Gln Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg
 1 5 10 15

Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
 20 25

<210> 58
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 Ala Thr Pro Glu Gln Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr
 1 5 10 15
 Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
 20 25

<210> 59
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 Thr Pro Glu Gln Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile
 1 5 10 15
 Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
 20

<210> 60
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Pro Glu Gln Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn
 1 5 10 15
 Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
 20

<210> 61
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 Glu Gln Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met
 1 5 10 15
 Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
 20

<210> 62
 <211> 21
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Gln Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu
1 5 10 15

Thr Arg Pro Arg Tyr
20

<210> 63

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr
1 5 10 15

Arg Pro Arg Tyr
20

<210> 64

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg
1 5 10 15

Pro Arg Tyr

<210> 65

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro
1 5 10 15

Arg Tyr

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg

	1	5	10	15
Tyr	0.00	0.00	0.00	0.00

```
<210> 67
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 67
Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
1 5 10 15

```
<210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 68
Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
1 5 10 15

```
<210> 69
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 69
Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
1 5 10

```
<210> 70
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 70
Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
1 5 10

```
<210> 71
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 71
Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr Arg Pro Arg Tyr
1 5 10

<210> 72
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Крысат

<400> 72
 Tyr Pro Ala Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
 20 25 30
 Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 73
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> СВИНЬЯ

<400> 73
 Tyr Pro Ala Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
 20 25 30
 Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 74
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Морская свинка

<400> 74
 Tyr Pro Ser Lys Pro Glu Ala Pro Gly Ser Asp Ala Ser Pro Glu Glu
 1 5 10 15
 Leu Ala Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
 20 25 30
 Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 75
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Крыса

<400> 75
 Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp

1 5 10 15
 Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr
 20 25 30
 Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 76
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Кролик

<400> 76
 Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp
 1 5 10 15
 Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr
 20 25 30
 Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 77
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Собака

<400> 77
 Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp
 1 5 10 15
 Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr
 20 25 30
 Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 78
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Свинья

<400> 78
 Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr
 20 25 30
 Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 79
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Корова

<400> 79
 Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr
 20 25 30
 Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 80
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Овца

<400> 80
 Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Asp Asp Ala Pro Ala Glu Asp
 1 5 10 15
 Leu Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr
 20 25 30
 Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 81
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Морская свинка

<400> 81
 Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro Ala Glu Asp
 1 5 10 15
 Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn Leu Ile Thr
 20 25 30
 Arg Gln Arg Tyr
 35

<210> 82
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Овца

<400> 82
 Ala Pro Leu Glu Pro Val Tyr Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln

1 5 10 15
 Met Ala Gln Tyr Ala Ala Asp Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr
 20 25 30
 Arg Pro Arg Tyr
 35

<210> 83
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> СВИНЬЯ

<400> 83
 Ala Pro Leu Glu Pro Val Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Thr Pro Glu Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr
 20 25 30
 Arg Pro Arg Tyr
 35

<210> 84
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Собака

<400> 84
 Ala Pro Leu Glu Pro Val Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Thr Pro Glu Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr
 20 25 30
 Arg Pro Arg Tyr
 35

<210> 85
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Кошка

<400> 85
 Ala Pro Leu Glu Pro Val Tyr Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr
 20 25 30
 Arg Pro Arg Tyr
 35

<210> 86
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Корова

<400> 86
 Ala Pro Leu Glu Pro Glu Tyr Pro Gly Asp Asp Ala Thr Pro Glu Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu Thr
 20 25 30
 Arg Pro Arg Tyr
 35

<210> 87
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Крыса

<400> 87
 Ala Pro Leu Glu Pro Met Tyr Pro Gly Asp Tyr Ala Thr His Glu Gln
 1 5 10 15
 Arg Ala Gln Tyr Glu Thr Gln Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Thr Leu Thr
 20 25 30
 Arg Pro Arg Tyr
 35

<210> 88
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Мышь

<400> 88
 Ala Pro Leu Glu Pro Met Tyr Pro Gly Asp Tyr Ala Thr Pro Glu Gln
 1 5 10 15
 Met Ala Gln Tyr Glu Thr Gln Leu Arg Arg Tyr Ile Asn Thr Leu Thr
 20 25 30
 Arg Pro Arg Tyr
 35

<210> 89
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Морская свинка

<400> 89
 Ala Pro Leu Glu Pro Val Tyr Pro Gly Asp Asn Ala Thr Pro Glu Gln

1 5 10 15
 Gln Met Ala Gln Tyr Ala Ala Glu Met Arg Arg Tyr Ile Asn Met Leu
 20 25 30
 Thr Arg Pro Arg Tyr
 35

<210> 90
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 90
 Asp Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20

<210> 91
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 91
 Thr Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu
 1 5 10 15
 Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20

<210> 92
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 92
 Val Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr
 1 5 10 15
 Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25

<210> 93
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 93
 Glu Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His
 1 5 10 15

Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25

<210> 94
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 94
 Asp Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg
 1 5 10 15

His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25

<210> 95
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 95
 Val Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala
 1 5 10 15

Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25 30

<210> 96
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 96
 Asp Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr
 1 5 10 15

Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25 30

<210> 97
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 97
 Gln Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg
 1 5 10 15

Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg
 20 25 30

Tyr

<210> 98
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 98
 Arg Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg
 20 25 30

Tyr

<210> 99
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 99
 Asn Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg
 20 25 30

Tyr

<210> 100
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 100
 Val Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
 1 5 10 15
 Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 101
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 101
 Leu Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
 1 5 10 15
 Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 20 25 30
 Arg Tyr

<210> 102
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 102
 Asp Asp Ala Ser Pro Asp Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg
 1 5 10 15
 His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25

<210> 103
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 103
 Asp Ala Pro Gly Glu Asp Ala Thr Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
 20 25 30

<210> 104
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 104
 Asn Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Asp Glu Leu Asn Arg
 1 5 10 15
 Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg
 20 25 30
 Tyr

<210> 105
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo sapeins

<400> 105
 Leu Lys Pro Glu Ala Pro Gly Asp Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
 1 5 10 15
 Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 20 25 30
 Arg Tyr



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2/6