

ÖZET

PRADER-WILLI SENDROMUNUN TEDAVİSİNDE KULLANIMA YÖNELİK ASİLLENMEMİŞ GİRELİN FRAGMENTLERİ

5

Bir sujede azalan girelin seviyeleri ve/veya azalan girelin/asillenmemiş girelin oranı için bir yöntem ve bir bileşim olup, yöntem, asillenmemiş girelinin, bunun bir fragmentinin, bunun bir analogunun ve/veya bunun farmasötik olarak uygun tuzları suya etkili bir miktar uygulanması içermektedir, burada girelin seviyelerindeki bir azalma ve/veya girelin/asillenmemiş girelin oranındaki bir azalma suya faydalıdır. Ayrıca asillenmemiş girelinin uygulanması yanıt verebilen ve/veya bundan faydalanabilen bir sujeninin belirlenmesi için biyoişaretleyiciler olarak girelin seviyesi ve/veya girelin/asillenmemiş girelin oranı kullanılır.

10

İSTEMLER

1. Yükselmiş girelin seviyelerine sahip bir sujede Prader-Willi Sendromu'nun tedavisinde kullanılmak için, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6'da belirtildiği gibi veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 25'te belirtildiği gibi peptidden oluşan asillenmemiş girelinin fragmentleri ve bunun farmasötik olarak uygun bir tuzu.

2. Bunun, yaklaşık 0.001 µg/kg ila yaklaşık 10 mg/kg'lık bir etkili miktarda söz konusu asillenmemiş girelin fragmentinin ve tuzun uygulanması içerdiği, istem 1'e göre kullanılmak için asillenmemiş girelin fragmentleri ve bunların tuzu.

3. Bunun, yaklaşık 1 µg/kg ila yaklaşık 1 mg/kg'lık bir etkili miktarda söz konusu asillenmemiş girelin fragmentinin ve tuzun uygulanması içerdiği, istemler 1 veya 2'den birine göre kullanılmak için asillenmemiş girelin fragmentleri ve bunların tuzu.

4. Söz konusu asillenmemiş girelin fragmenti ve bunun farmasötik olarak uygun tuzları, intravenöz, subkütanöz, transdermal, oral, bukkal, sublingual, nazal ve inhalasyondan oluşan gruptan seçilen bir yol aracılığıyla uygulandığında, istemler 1 ila 3'ten birine göre kullanılmak için asillenmemiş girelin fragmentleri ve bunların tuzu.

5. Yükselmiş girelin seviyelerinin yükselmiş dolaşan girelin seviyeleri olduğu, istemler 1 ila 4'ten birine göre kullanılmak için asillenmemiş girelin fragmentleri ve bunların tuzu.

6. İstemler 1 ila 5'ten birine göre kullanılmak için asillenmemiş girelin fragmentleri ve bunların tuzu olup, burada hasta

- sujeden dolaşan girelinin bir seviyesinin belirlenmesi, ve
- dolaşan girelin seviyesinin yükselip yükselmediğini ileten bilginin elde edilmesi için dolaşan girelinin bir referans seviyesine en azından kısmi olarak bağli şekilde dolaşan girelinin seviyesinin işlenmesi ile teşhis edilmektedir.

TARİFNAME

PRADER-WILLI SENDROMUNUN TEDAVİSİNDE KULLANIMA YÖNELİK ASİLENMEMİŞ GİRELİN FRAGMENTLERİ

5

TEKNİK ALAN

Bu buluş, bir sujede girelin seviyelerinin ve/veya girelin/asillenmemiş girelin oranının modüle edilmesi için asillenmemiş girelinin, bunun fragmentlerinin ve/veya analoglarının kullanımı ile
10 ilgilidir, burada bu tür modülasyon sujeje faydalı olmaktadır. Bu buluş, bir sujede girelin seviyelerini ve girelin/asillenmemiş girelin oranını modüle eden asillenmemiş girelin, bunun fragmentleri ve/veya analogları içeren bileşim ile ilgilidir, burada bu tür modülasyon sujeje faydalı olmaktadır. Buluş, ayrıca asillenmemiş girelinin uygulanmasıyla yanıt verebilen ve/veya bundan faydalanabilen bir sujeninin belirlenmesi için biyoışaretleyiciler olarak girelin seviyesi
15 ve/veya girelin/asillenmemiş girelin oranının kullanımı ile ilgilidir.

ÖNCEKİ TEKNİK

Girelin (ayrıkça, "asillenmiş girelin" olarak ifade edilmektedir veya "AG" olarak
20 kısaltılmaktadır), sıçan midesinde saflaştırılan ve belirlenen ve Ser3 kalıntısı üzerinde bir *n*-oktanoil modifikasyonu varlığıyla karakterize edilen bir 28 amino asitli peptiddir (Ref. 1). Girelinin asillenmesi, enzim girelin O-asil transferaz (GOAT) ile katalizlenmektedir. GOAT'ın ekspresyonu çoğunlukla midede ve bağırsaktadır. Girelin, büyüme hormonu (GH) salgı uyandırıcı reseptörünün (GHSR-1a) endojen ligandıdır (Refler. 2, 3). Girelin, gıda alımı
25 uyaran ve enerji masrafını modüle eden bir etkili oreksijenik faktör olarak yaygın bir şekilde şu an tanımlanmaktadır (Refler. 4, 5 ve 6). Çevresel seviyede, Girelin, glikoz ve lipid metabolizmasını regüle eden kendi temel fizyolojik eylemini muhtemelen uygulamaktadır (Ref. 7). Aslında, girelin bir diyabetik eyleme sahiptir (Ref. 8) ve glikoz-uyarılı insülin salgı bastırılmaktadır ve glikoz toleransı bozulmaktadır (Ref. 9). Bu şekilde, yükselmiş
30 plazma girelini, diyabet ve obezite gibi metabolizma ve büyümenin belirli rahatsızlıklarıyla ilgilidir. Yükselmiş plazma girelin seviyeleri, Prader-Willi Sendromu'na (PWS) sahip yetişkinler ve çocuklar arasında gösterilmiştir (Ref. 10 ve 11). PWS, GH eksikliğine sahip çoğu hastayla ilişkilendirilen bir genetik obezite sendromudur. PWS'li çocuklar, bir doymaz iştahla birlikte bir hız kilo kaybı sunmaktadır. PWS'de girelinin gelişimi üzerindeki çalışmalar, PWS'de
35 gözlemlenen hiperfajinin girelinin bilinen oreksijenik etkisi ile tutarlı yükselmiş girelin seviyeleri ile pozitif olarak ilişkilendirildiği önemli bir temel sağlamıştır (Ref. 12).

Asillenmemiş girelin (ayrıca "desasil girelin" olarak ifade edilmektedir veya "UAG" olarak kısaltılmaktadır), girelinin asillenmemiş biçimidir. Plazma ve dokudaki kendi konsantrasyonu girelin ile karşılaştırıldığında daha yüksektir. UAG, fizyolojik konsantrasyonlarda sadece bilinen girelin reseptörü GHSR-1a'yı bağlamada başarısız olduğundan ve GH salgısında hiçbir fizyolojik etkiye sahip olmadığından dolayı hiçbir fizyolojik role sahip olmayan bir ürün olarak uzun süre düşünülmüştür (Ref. 15). Bununla birlikte, UAG, biyolojik olarak aktif peptiddir, özellikle metabolik seviyede ve kendi uygulamasında gıda alımının azalmasıyla ve gastrik boşaltmanın ertelenmesiyle bir negatif enerji dengesini indüklediği gösterilmiştir (Ref. 16). Farede UAG'nin aşırı ekspresyonu, insülin hassasiyeti ve glikoz toleransı ile yağ birikiminde bir azalmayla sonuçlanmaktadır (Ref. 16 ve 17).

UAG, sağlıklı gönüllülerde, beraberinde uygulandığında, girelinin hiperglisemik etkilerini önlediği gösterilmiştir. özellikle referans ile kendi özünde buraya dahil edilen, U.S. Patenti 7,825,090 sayılı patent dokümanına bakınız. Bu başlangıç gözlemi, UAG'nin anti-diyabetik potansiyel üzerinde birkaç rapor ile takip edildi (Ref. 18, 19, 30, 31 ve 32).

In vitro, *in vivo* ve klinik kanıtları UAG'nin sağlıklı gönüllülerde ve GH-eksikliğine sahip hastalarda girelinin diyabetojenik etkilerini önlediğini göstermektedir (Ref. 18 ve 19). Bu, insan hepatositleri tarafından hem bazal hem de girelin-indüklenmiş glikozu inhibe etmektedir (Ref. 31). Sıçanlarda, UAG, glikoza yanıt olarak portal insülini geliştirmektedir (Ref. 32) ve UAG'yi aşırı eksprese eden transjenik farelerde gözlemlendiği gibi yağ birikmesi ve trigliserid seviyelerini azaltmaktadır (Ref. 16). *In vitro*, UAG, insülinom hücrelerinden insülin salgısını stimüle etmektedir (Ref. 32) ve proliferasyonu teşvik etmektedir ve beta hücrelerinin apoptozunu inhibe edilmektedir (Ref. 33).

UAG'nin, bunun fragmentleri ve analoglarının anti-diyabetojenik etkileri ve girelin-antagonize edici etkileri U.S. Patent Numarası 7,485,620; U.S. Patent Numarası 8,222,217; U.S. Patent Numarası 8,318,664 ve WO 2008/145749 numaralı patente rapor edilmiştir.

Dolaşan anjiyojenik hücreler (CAC) üzerindeki mevcut deneyler, UAG'nin tip 2 diyabetli hastaların olumsuz etkilediği bilinen vasküler yeni biçimlendirme prosesini faydalı olarak etkilediğini göstermektedir. CAC üzerinde UAG'nin etkileri, U.S. Patent Başvuru Seri Numarası 2010/0016226 ve WO 2009/150214'te rapor edildi.

Obez fare ve insanların, obezitenin bir göreceli UAG eksikliği ile korelasyon halinde

olabildiğini göstererek, normal kilodaki suşelerden daha düşük UAG sevişeleri gösterdiği rapor edilmiştir (Refler. 34, 35 ve 21). İnsüline dirençli obez suşelerin, insüline hassas obez suşeler ile karşılaştırıldığında bir yükselmiş AG/UAG oranına sahip olduğu gözlemlenmiştir (Refler. 20 ve 22).

5

Girelin ve GHS-R'yi (yani, girelin antagonistleri) hedefleyen tedaviler, obezite ve diğer durumlar, girelinle ilişkilendirilen rahatsızlıklar ve hastalara karşı savaşmak için etkili farmakolojik yollar olarak önerilmiştir. Birçok GHS-R ligandları ve obezite karşılaşılar önerildi (Ref. 24). Girelin, girelin enantiomerleri ve girelin asil-transferaz (GOAT) inhibisyonuna karşı antikorlarındükleyen diğer farmakolojik yaklaşımlar (Ref. 25) araştırılmıştır ancak, etkililik eksikliği, seçici olmaması ve sürdürülen kilonun eksikliğinden dolayı bu farmakolojik yaklaşımlar henüz piyasaya ulaşmamıştır (Ref. 26).

10

Bu yüzden, suşelerde dolaşan girelin sevişelerinin ve/veya dolaşan girelin/asillenmemiş girelin oranının modüle edilmesinin etkili ve daha doğrudan bir yoluna teknikte bir ihtiyaç bulunmaktadır burada bu tür modülasyon, suşeye ve girelin sevişeleri ve girelin/asillenmemiş girelin oranının modülasyonundan faydalanabilen bu suşelerin belirlenmesinde daha etkili yollar için faydalıdır

15

20 BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Buluş, yükselmiş girelin sevişelerine sahip, özellikle yükselmiş dolaşan girelin sevişelerine sahip bir suşede Prader-Willi Sendromunun tedavisinde kullanılm için SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6'da belirtildiği gibi veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 25'te belirtildiği gibi peptidden oluşan asillenmemiş girelinin fragmentini ve bunun farmasötik olarak uygun tuzunu sağlamaktadır Buluş, yükselmiş girelin sevişelerine sahip bir suşede Prader-Willi Sendromu'nun tedavisinde kullanılm için asillenmemiş girelin fragmentleri ve bunun tuzunu sağlamaktadır burada yaklaşık 0.001 µg/kg ila yaklaşık 10 mg/kg, daha tercihen yaklaşık 1 µg/kg ila yaklaşık 1 mg/kg söz konusu asillenmemiş girelin fragmentinin ve tuzun etkili bir miktarında uygulanmasıdır.

25

30

Buluşa göre, söz konusu asillenmemiş girelin fragmenti ve bunun farmasötik olarak uygun tuzları intravenöz, subkütanoz, transdermal, oral, bukkal, sublingual, nazal ve inhalasyondan oluşan gruptan seçilen bir yolla uygulanabilmektedir.

35

Buluş, ayrıca yükselmiş girelin sevişelerine sahip bir suşede Prader-Willi Sendromu'nun

tedavisinde kullanılmak için SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6'da belirtildiği gibi veya SEKANS KİMLİK NUMARASI: 25'te belirtildiği gibi peptidden oluşan asillenmemiş girelin fragmentleri ve bunun bir farmasötik olarak uygun tuzunu sağlamaktadır burada hasta

- 5 - sujeden dolaşan girelin seviyesinin tespit edilmesiyle, ve
- dolaşan girelin seviyesinin yükselip yükselmediğini ileten bilgiyi türetmek için dolaşan girelinin bir referans seviyesine en azından kısmi olarak bağlı şekilde dolaşan girelinin seviyesinin işlenmesi ile belirlenmektedir.

10 ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1, mevcut buluşun bir yapılandırılmasına göre, Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) içeren bir çalışma protokolünün bir şematik temsilidir. SBM, Standart Kahvaltı/Yemeği'ni ifade etmektedir.

15 Şekiller 2A ve 2B, T2DM sujelerinde AG serum seviyeleri üzerinde UAG infüzyonunun etkisini gösteren grafiklerdir. Şekiller 2A'da, pg/ml olarak AG serum seviyeleri, SBM'den bir saat önce ve sonra plasebo veya UAG uygulamalarından takiben ölçüldü. Şekiller 2B'de, pg/ml olarak UAG serum seviyeleri, SBM'den bir saat önce ve sonra plasebo veya UAG uygulamalarından takiben ölçüldü.

20 Şekiller 3A ve 3B, bir sürekli glikoz izleme cihazı (CGMS® iPro™ Sürekli Glikoz Okuyucu, Medtronic trading. Hollanda) ile ölçüldüğü gibi T2DM sujelerinde ortalama post-prandiyal glikoz seviyelerini gösteren grafiklerdir. Şekil 3A, SBM ve ardından plasebo, UAG 3 mcg(mikrogram)/kg/sa ve UAG 10 mcg/kg/sa infüzyonlarından sonra ortalama mutlak glikoz seviyelerini göstermektedir. Tekrarlanan ölçümler ANOVA $p<0.0001$; Bonferroni'nin Çoklu Karşılaştırmalar plaseboya karşı 3 mcg NS; plaseboya karşı 10 mcg $p<0.001$; 3 mcg'ye karşı 10 mcg $p<0.001$. Şekil 3B, üç işlem görmüş grup için ortalama t0-t180 glikoz seviyelerini göstermektedir.

Şekiller 4A ve 4B, T2DM sujelerinde ortalama post-prandiyal glikoz seviyelerini gösteren grafiklerdir. Şekil 4A, plasebo, UAG 3 mcg/kg/sa ve UAG 10 mcg/kg/sa infüzyonlarından takiben yemek öncesi referans çizgisinden glikoz seviyelerindeki değişimi göstermektedir. Tekrarlanan ölçümler ANOVA $p<0.0001$; Bonferroni'nin Çoklu Karşılaştırmalar plaseboya karşı 3 mcg $p<0.001$; plaseboya karşı 10 mcg $p<0.001$; 3 mcg'ye karşı 10 mcg $p<0.05$. Şekil 4B, üç işlem görmüş grup için ortalama t0-t180 glikoz seviyelerini göstermektedir.

Şekiller 5A ve 5B, plasebo, UAG 3 mcg/kg/sa ve UAG 10 mcg/kg/sa infüzyonlarından takiben çalışmanın sekiz sujesinde SBM'den sonra pik plazma glikoz seviyelerini gösteren grafiklerdir. Wilcoxon uyumlu-çiftler eşleştirilmiş dizi testi; *: 10 mcg'ye karşı Placebo,

p<0.05.

Şekiller 6A, 6B ve 6C, açlık bazal AG ve/veya UAG konsantrasyonları ve UAG uygulamasına glikemik yanıt arasındaki bir korelasyonun varlığını gösteren grafiklerdir. Şekil 6A'daki grafik, SBM'den sonra açlık bazal AG seviyeleri ve pik glikoz seviyelerindeki değişimi (UAG'ye karşı plasebo uygulaması takiben) arasındaki korelasyonu göstermektedir. Şekil 6B'deki grafik, iPro sürekli glikoz ölçümleri kullanılarak SBM'den sonra açlık bazal AG seviyeleri ve AUC glikoz seviyelerindeki değişimi (UAG'ye karşı plasebo uygulaması takiben) arasındaki korelasyonu göstermektedir. Şekil 6C'deki grafik, iPro sürekli glikoz ölçümleri kullanılarak SBM'den sonra UAG seviyeleri üzerinden açlık bazal AG'nin oranı ve AUC glikoz seviyelerindeki değişim (UAG'ye karşı plasebo uygulaması takiben) arasındaki korelasyonu göstermektedir.

Şekil 7A, mevcut buluşun başka bir yapılandırılmasına göre T2DM subjelerinde Hiperinsülinemik-Öglisemik Yığılma çalışma protokolünün şematik bir temsildir.

Şekil 7B, Şekil 7A'da şematik hale getirildiği gibi protokol sırasında M-indeksi, insülin hassasiyetinin yansıtılması olarak UAG'nin etkilerini gösteren bir grafikdir. Referans çizgisinden M-indeksinin değişimi, plasebo ve UAG infüzyonlarından sonra ölçüldü. *: p<0.05, Tek uçlu Mann Whitney testi.

Şekiller 7C ve 7D, T2DM subjelerinde bazal AG seviyeleri üzerinde bir kısa UAG infüzyonunun etkilerini gösteren grafiklerdir. Şekil 7C, UAG infüzyonu ve ardından 2.5 saatlik UAG infüzyonu öncesinde dolaşan AG seviyelerini göstermektedir. Şekil 7D, 2.5 saatlik UAG infüzyonundan (öğlen 12:00'de [AG] seviyesi - sabah 9:30'da [AG] seviyeleri) sonra referans çizgisinden AG değişimini göstermektedir. Wilcoxon uyumlu-çiftler eşleştirilmiş dizi testi; *: p<0.05; **: p<0.01.

Şekil 8, gösterilen çalışma periyodu üzerinden AG-indüklenmiş gıda alımı üzerine sıklık UAG fragmentinin (6-13) etkilerini gösteren bir grafikdir. *p<0.001: Kruskal-Wallis Tek Yollu ANOVA. Gruplar arasındaki farklılıklar Dunn testi ile değerlendirildi.

AYRINTILI AÇIKLAMA

Mevcut buluş, sadece bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, buluş sahipleri tarafından UAG uygulamasının T2DM'li subjelerde dolaşan AG'nin seviyelerini azalttığı bulgularından kaynaklanmaktadır. Mevcut buluş, ayrıca bazal AG'nin seviyeleri daha yüksek oldukça, örneğin obezite, hiperglisemi, insülin direnci, yağ birikmesi, hiperfaji, insülin direnciyle ilişkilendirilen obezite gibi AG seviyeleri ile ilişkilendirilen zararlı etkilerin azaltılmasına ve AG seviyelerinin azaltılmasında UAG'nin etkilerinin daha önemli olduğuna dair bulgularından kaynaklanmaktadır. Buluş sahipleri, dolaşan AG/UAG'nin oranı daha yüksek oldukça, bu tür

oranın azalması ve AG/UAG oranıyla ilişkilendirilen zararlı etkilerin bastırılmasında UAG'nin daha etkili olduğunu bulmuşlardır

Bu bakımdan, dolaşan AG seviyeleri ve dolaşan AG/UAG oranının her biri, sujenin UAG'nin uygulanmasına yanıt olma ve/veya bundan faydalanma ihtimalinin belirlenmesi için biyoışaretleyiciler olarak kullanılabilmektedir. Bu biyoışaretleyiciler bu yüzden sadece bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla obezite, diyabet, insülin direnci, Prader-Willi, hiperfaji ve hipergirelinemi gibi bir durumdan rahatsız olan sujelerin bir popülasyonu içinde belirlenmesi için kullanılabilmektedir, sujelerin UAG uygulamasına yanıt vermesi ve/veya bundan faydalanmaları muhtemeldir. Bir sujede dolaşan AG seviyeleri daha yüksek oldukça ve/veya dolaşan AG/UAG oranı daha yüksek oldukça, bu sujenin UAG'nin uygulanmasına yanıt olma ve/veya bundan faydalanması daha fazla olacaktır

Şimdiye kadar, çalışmalar, UAG'nin örneğin glikoz ve insülin metabolizmaları üzerinde girelinin çevresel eylemlerini etkisiz hale getirdiğini raporlamıştır. Mevcut çalışma, UAG'nin uygulanmasıyla dolaşan girelin seviyelerini bastırarak birinci kanı sağlamaktadır ve AG seviyeleri tarafından ve/veya AG/UAG oranı tarafından etkilenen metabolik parametrelerin geliştirilmesinde UAG'nin etkililiği ve dolaşan AG'nin seviyesi arasındaki bir korelasyonunun varlığını birinci kanı sağlamaktadır

Burada sunulan şaşırtıcı gösterimleri, uygulamaları ve asillenmemiş girelinin, AG seviyelerinden ve/veya AG/UAG oranından kaynaklanan durumları kolaylaştırması, iyileştirilmesi ve/veya tedavisini içermesi amacıyla kullanılabildiği göstergelerin genişletilmesine olanak sağlamaktadır. Bu gösterimler, uygulamaları ve asillenmemiş girelinin, yükselmiş AG seviyelerinden ve/veya yükselmiş AG/UAG oranından kaynaklanan durumları kolaylaştırması, iyileştirilmesi ve/veya tedavisini içermesi amacıyla kullanılabildiği göstergelerin genişletilmesine olanak sağlamaktadır. Burada kullanıldığı gibi, "yükselmiş AG seviye(ler)i" ifadesi, normal ve/veya sağlıklı sujelerde gözlemlenen AG seviyesi üzerinde dolaşan AG'nin bir seviyesini ifade etmektedir. Bazı uygulamalarda, "yükselmiş AG seviye(ler)i" ifadesi, AG ile ilişkilendirilen bir veya daha fazla zararlı fizyolojik semptomlarda bir sujede görüldüğü, sürdürüldüğü veya kötü hale getirildiği dolaşan AG'nin bir seviyesini ifade etmektedir.

Burada kullanıldığı gibi, "yükselmiş AG/UAG seviye(ler)i" ifadesi, normal ve/veya sağlıklı sujelerde gözlemlenen AG/UAG oranının üzerinde dolaşan AG/UAG'nin bir oranını ifade etmektedir. Bazı uygulamalarda, "yükselmiş AG/UAG oranı" ifadesi, AG/UAG oranıyla

ilişkilendirilen bir veya daha fazla fizyolojik semptomları bir sujede görüldüğü veya sürdürüldüğü veya kötü hale getirildiği dolaşan AG/UAG'nin bir oranı ifade etmektedir.

5 Birçok faktör, normal sujede girelin ve asillenmemiş girelinin dolaşım seviyelerini etkileyebildiği anlaşılmaktadır. Bu tür faktörlerin örnekleri, sadece bunlarla sınırlanmamak kaydıyla, cinsiyet, yaş, fitnes, vücut kitle indeksi (BMI), yeme alışkanlıkları vb.'ni içermektedir.

10 Burada kullanıldığı gibi, "girelinin inhibisyonu" ifadesi, girelin seviyelerinde bir azalmadan ve/veya kendi biyolojik aktivitenin bir bozulmasından meydana gelen girelinin biyolojik aktivitesinin bir bozulması ifade etmektedir.

15 Teknikte uzman bir kişi, bir sujede AG ve UAG seviyelerinin ölçülmesi için teknikler ve tahliller ile bilindik olacaktır. Bu tür teknikler 4-(2-aminoetil)benzensülfonil florür hidroklorür (AEBSF) veya proteaz inhibitörlerinin diğer kokteyli gibi proteaz inhibitörlerinin kullanımı bulunduran teknikleri içerebilmektedir.

20 Bu yapılandırılan bir uygulamasında, bir obez suje, söz konusu suje için normal kilodan ortalama olarak %20, ortalama olarak %25, ortalama olarak %30 veya daha fazla bir vücut ağırlığına sahip olması ile karakterize edilmektedir. Normal vücut ağırlığı, örneğin AG seviyeleri normal olduğunda ve/veya AG/UAG oranı normal olduğunda gibi önceki bir noktada sujenin ağırlığının bir karşılaştırması ile, veya benzer bir yaş ve/veya durumun diğer suyelerinin ortalaması ile karşılaştırılması gibi sujenin AG seviyeleri ve/veya AG/UAG oranının bir karşılaştırması ile belirlenebilmektedir.

25 Bu yapılandırılan diğer bir uygulamasında, bir aşırı kilolu suje, söz konusu suje için normal vücut ağırlığından ortalama olarak %5'ten daha fazla ila ortalama olarak %20 daha fazla vücut ağırlığı ile karakterize edilmektedir. Normal vücut ağırlığı, örneğin AG seviyeleri normal olduğunda ve/veya AG/UAG oranı normal olduğunda gibi önceki bir noktada sujenin ağırlığının bir karşılaştırması ile, veya benzer bir yaş ve/veya durumun diğer suyelerinin ortalaması ile karşılaştırılması gibi AG seviyeleri ve/veya AG/UAG oranının bir karşılaştırması ile belirlenebilmektedir.

35 Bu yapılandırılan diğer bir uygulamasında, bir normal suje, söz konusu suje için normal vücut ağırlığından ortalama olarak %5'ten daha fazla ila ortalama olarak %5'ten daha az vücut ağırlığı ile karakterize edilmektedir. Normal vücut ağırlığı, örneğin AG seviyeleri normal

olduğunda ve/veya AG/UAG oranı normal olduğunda gibi önceki bir zaman noktasında sujenin ağırlığına bir karşılaştırması ile, veya benzer bir yaş ve/veya durumun diğer sujelerinin ortalamaları ile karşılaştırıldığı gibi AG seviyeleri ve/veya AG/UAG oranının bir karşılaştırması ile belirlenebilmektedir. Bir normal kiloda suje, 19 ila 22 ortalama aralığında bir BMI'ya sahip olabilmektedir.

Aksi belirtilmediği takdirde, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler, buluşun sürdürüldüğü teknikteki uzman bir kişi tarafından yaygın bir şekilde açıklandığı gibi aynı anlamda sahiptir.

i) Asillenmemiş girelin, ve fragmentler

Terimler "asillenmemiş girelin", "dez-asil girelin" ve "UAG" kavramlarına, amino asit sekansının aşağıdaki olduğu SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1'de belirtilen amino asit sekansına sahip peptidler anlamına gelmesi amaçlanmaktadır

Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser-
Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1)

Asillenmemiş girelin UAG (1-28) olarak da ifade edilebilmektedir.

"Peptid", "polipeptid" veya "protein", uzunluk veya post-translasyon modifikasyonu (örn., glikosilat veya fosforilasyon) veya kimyasal modifikasyonuna bakılmaksızın herhangi bir amino asitlerin zinciri veya D-Tri. ornitin, amino-adipik asit gibi doğal olmayan veya olağandışı amino asit içerenler anlamına gelmektedir. Terimler, mevcut başvuruda değiştirilebilir bir biçimde kullanılmaktadır

"Fragmentler" ve "bunun fragmentlerinin" ekspresyonları UAG gibi bir peptidin amino asit fragmentlerini ifade etmektedir.

UAG'nin fragmentleri, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1'de gösterilen amino asit sekansından daha kısa ve bu yüzden 28 amino asit kalıntısından daha kısa. UAG'nin fragmentleri bu yüzden 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 veya 4 amino asit kalıntısı uzunluğunda olabilmektedir. Örneğin, UAG'nin fragmentleri, aşağıdaki Tablo 1'de gösterilen amino asit sekanslarına sahip olabilmektedir:

Tablo 1:

Fragment	SEKANS KİMLİK NUMARASI:	Amino Asit Sekansı
UAG (1-14)	2	Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln
UAG (1-18)	3	Gly-Ser-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser
UAG (1-5)	4	Gly-Ser-Ser-Phe-Leu
UAG (17-28)	5	Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-Pro-Ala-Lys-Leu-Gln-Pro-Arg
UAG (6-13)	6	Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln
UAG (8-13)	7	Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln
UAG (8-12)	8	Glu-His-Gln-Arg-Val
UAG (6-18)	9	Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val-Gln-Gln-Arg-Lys-Glu-Ser
UAG (8-11)	10	Glu-His-Gln-Arg
UAG (9-12)	11	His-Gln-Arg-Val
UAG (9-11)	29	His-Gln-Arg
UAG (14-1)	30	Gln Gln Val Arg Gln His Glu Pro Ser Leu Phe Ser Ser Gly

Bazı UAG fragmentleri U.S. Patent Numarası 8,222,217; U.S. Patent Numarası 8,318,664 ve WO/2008/145749 numaralı patent dokümanında bildirilmiştir, burada UAG'nin biyolojik aktivitesini sürdürmesi için en küçük UAG fragmentinin, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11 olarak burada gösterilen UAG (9-12) olduğu açıklanmıştır.

Buluşun bir birinci yapılandırmasında, UAG'nin fragmenti SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6 olarak belirtildiği gibi UAG (6-13)'tür.

Bir yapılandırmada, UAG, bunun fragmentleri veya analogları gibi polipeptidler "saflaştırılmış", "izole edilmiş" veya "büyük oranda saf" biçiminde kullanılmaktadır. Polipeptidler, bunlara doğal olarak eşlik eden bileşenlerden ayrıldığında "saflaştırılmış", "izole" veya "büyük oranda saf"lardır. Tipik olarak, bir bileşik, bir numunedeki toplam malzemenin ağırlıkça en az %60, %65, %70, %75, %80, %85, %90, %95, %96, %97, %98, veya %99'u olduğunda saftır.

Mevcut buluşa göre belirli peptidler, Nor C-ucu baştan sona bağlanacak şekilde siklik biçimde olabilmektedir. Bu tür peptid türevleri, düz zincir moleküllerden çember bileşiklere

dönüşmemiş peptidlere göre gelişmiş stabilite ve biyoyararlanıma sahip olabilmektedir.

Siklik peptidlerin örnekleri şunları içermektedir: siklik UAG (1-14), siklik UAG (1-18), siklik UAG (17-28), siklik UAG (6-13), siklik UAG (8-13), siklik UAG (8-12), siklik UAG (8-11), siklik UAG (9-12) ve siklik UAG (9-11).

Buluşun diğer yapılandırılmasında, UAG'nin fragmenti SEKANS KİMLİK NUMARASI: 25 olarak belirtildiği gibi siklik UAG (6-13)'tür.

- 10 Peptidlerin düz zincir moleküllerden çember bileşiklere dönüştürülmesine yönelik yöntemler teknikte iyi bilinmektedir ve örneğin buna iki yan zincir fonksiyonel gruplar arasında disülfid bağ oluşumu, bir yan zincir fonksiyonel grup ve omurga α -amino veya karboksil fonksiyonu arasındaki amid veya ester bağ oluşumu, iki yan zincir fonksiyonel grup arasında amid veya ester bağ oluşumu veya omurga α -amino ve karboksil fonksiyonları arasında amid bağ oluşumu ile ulaşılabilir. Bu siklizasyon reaksiyonları çözeltide yüksek sulandığında geleneksel olarak yürütülmüştür. Peptid reçineye eklenirken, siklizasyona yaygın bir şekilde ulaşmaktadır. Bir katı destek üzerinde siklik peptidlerin sentezlenmesine yönelik en yaygın yollardan biri, reçineye bir amino asit yan zincirinin eklenmesiyle olmaktadır. Uygun koruma stratejileri kullanılarak, C- ve N-ucunun, zincir düzenlemesinden sonra reçine üzerinde seçici bir şekilde koruyucu grubu uzaklaştırılabilir ve düz zincir moleküllerden çember bileşiklere dönüştürülebilmektedir. Bu strateji yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve tert-bütüloksikarbonil (Boc) veya 9-florenilmetoksikarbonil (Fmoc) protokolleri ile uyumludur. Bununla birlikte, katı desteğe eklenmesi için uygun yan zincir fonksiyonelliği içeren peptidler ile sonuçlanmaktadır. Birçok yaklaşım, siklik peptidlerin etkili sentezine ulaşmak için kullanılabilmektedir. Siklik peptidlerin sentezlenmesi için bir prosedür, reçineden eşzamanlı yararlanma ile siklizasyona dayanmaktadır. Bir uygun peptid sekansı reçine üzerindeki katı faz sentezi ile birleştirildikten veya bir doğrusal sekans reçineye eklendikten sonra, koruyucu grubu uzaklaştırılan amino grup, korunan siklik peptidlerini üretmek için kendi bağlama aktif bağlantısı ile reaksiyona girebilmektedir. Genel olarak, bir nihai koruyucu grubun uzaklaştırılmasından önce hedef siklik peptidi vermesi için gereklidir.

- Siklizasyonun bir biçimi olan laktamazasyon, Fmoc sentezi kullanılarak bir laktam köprüsü oluşturmak için gerçekleştirilebilmektedir, lateral zincirlerde farklı koruyucu gruplara sahip amino asitler, örneğin, sadece bunlarla sonuçlanmamak kaydıyla beta esterdeki (veya glutamik asit için gama ester) alil ester ile korunan aspartik asit (veya glutamik) ve N- ϵ 'de aliloksi karbamat ile korunan lizine uygulanabilmektedir. Sentezin sonunda, aspartik asit ve

lizinin Allok, alil ve allok koruyucu gruplarından farklı Fmoc, Boc veya diğer koruyucu grup ile korunan peptidin N-ucu, laktam köprüsünü üretmek için PyAOP (7-Azabenzotriazol-1-iloksitris(pirolidino) fosfonyum-hekzaflorofosfat) kullanılarak siklizasyon ile takip edilen örneğin palladyum (0) ile koruyucu grup uzaklaştırılabilmektedir.

5

Aksi belirtilmediği durumda, burada isimlendirilen bir amino asit L-formunu ifade etmektedir. Teknikte daha iyi bilinen kısıtlamalar sola dönen amino asitleri (L-amino asitler veya L veya L-formu) ve sağa dönen amino asitler (D-amino asitler veya D veya D-formu), Alanin (Ala veya A), Arjinin (Arg veya R), Asparajin (Asn veya N), Aspartik asit (Asp veya D), Sistein (Cys veya C), Glutamik asit (Glu veya E), Glutamin (Gin veya Q), Glisin (Gly veya G), Histidin (His veya H), İzolösin (Ile veya I), Lösin (Leu veya L), Lisin (Lys veya K), Metiyonin (Met veya M), Fenilalanin (Phe veya F), Pirolin (Pro veya P), Serin (Ser veya S), Teronin (Thr veya T), Triptofan (Trp veya W), Tirozin (Tyr veya Y) ve Valin (Val veya V) içeren amino asitleri açmak için kullanılabilecek Natif peptid sekansındaki bir L-amino asit kalıtsal olarak sadece bunlarla sınırlı olmamak kaydıyla, 4-hidroksipirolin veya hidroksilizin veya P-alanin veya homoserin gibi bir protein olmayan amino asit gibi karşılaşılan D-amino asitleri, nadir amino asitlerden herhangi biri veya proteinlerde yaygın bir şekilde bulunan 20-L amino asitlerinin herhangi birine değiştirilebilmektedir.

10

15

20

Buluşun belirli yönleri UAG polinükleotidlerini kullanmaktadır. Bunlar, uygulamada tanımlanan UAG polipeptidleri, fragmentleri ve analogları kodlayan izole polinükleotidleri içermektedir.

Burada kullanıldığı gibi, "polinükleotid", birden çok deoksiribonükleotidleri veya nükleozid altbirimlerinden oluşan bir molekülü ifade etmektedir. Nükleozid altbirimler arasındaki bağlantı fosfatlar, fosfonatlar, fosforamidatlar, fosforotiyoatlar veya benzerleri tarafından veya peptid nükleik asitlerde (PNA'lar) kullanılan peptoid-tipi bağlantılar gibi teknikte bilindiğinden dolayı fosfat olmayan gruplar tarafından sağlanabilmektedir. Bağlayıcı gruplar kiral veya akiral olabilmektedir. Oligonükleotidler veya polinükleotidler, yüz veya bin nükleozid altbirimlerine 2 nükleozid altbirimlerinden uzunluk aralığında olabilmektedir.

25

30

Oligonükleotidler tercihen 5 ila 100 altbirim uzunluğu ve daha tercihen 5 ila 60 altbirim uzunluğunda iken, polinükleotid uzunluğu daha büyük olabilmektedir (örn., 100'e kadar). Polinükleotid DNA ve RNA'dan herhangi biri olabilmektedir. DNA, genomik DNA, bir genomik DNA kütüphanesi, bir hücre veya dokudan türetilen cDNA ve sentetik DNA'nın herhangi bir biçiminde olabilmektedir. Buna ek olarak, mevcut buluş, belirli yönlerde, bakteriyofaj, plazmid, kozmid veya fajimid içeren vektörleri kullanmaktadır.

35

Mevcut buluşun polipeptidlerine referans olarak "biyolojik aktivite" veya "biyolojik özellik" veya "aktivite" terimi, değiştirilebilir bir biçimde burada kullanılmaktadır ve buluşun polipeptidlerinin farmakolojik, biyolojik veya hücrel yeterliklerini ancak sadece bunlarla sınırlanmamak kaydıyla mevcut buluşta açıklandığı gibi UAG'nin biyolojik fonksiyonlarında UAG'nin yer değiştirme kapasitesini, öneğin sadece bunlarla sınırlanmamak kaydıyla, AG'nin modüle edilmesini; AG'nin inhibe edilmesini; dolaşan AG seviyelerinin azalmasını/yükselmiş AG seviyelerinin azalmasını/dolaşan AG/UAG oranının azalmasını/dolaşan yükselmiş AG/UAG oranının azalmasını; AG seviyeleri ve/veye AG/UAG seviyeleri tarafından indüklenen semptomların hafifletilmesini; dolaşan AG ve/veya dolaşan AG/UAG oranıyla ilişkilendirilen durumların kolaylaştırılmasını önlenmesini ve/veya tedavi edilmesini ve yükselmiş dolaşan AG ve/veya yükselmiş dolaşan AG/UAG oranıyla ilişkilendirilen durumların kolaylaştırılmasını önlenmesini ve/veya tedavi edilmesini ifade etmektedir.

UAG eylemleri fragmentler UAG (6-13) (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6), UAG (8-13) (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 7), UAG (8-12) (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 8), UAG (8-11) (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 12), UAG (9-12) (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 11) ve UAG (9-11) (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 29) ile korunduğu önceden gösterilmiştir. U.S. Patents 8,222,217 ve 8,318,664 numaralarındaki glikoz, insülin ve lipid metabolizmalar üzerinde UAG'nin tüm uzunluğunun aktivitesini bu fragmentlerin sürdürdüğünü göstermiştir. UAG'nin (1-14) (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 3) ve isimlendirilen UAG'nin (14-1) (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 30) invers sekansına sahip bir peptid, UAG fragmentlerini test eden deneylerde bir negatif kontrol olarak kullanılarak UAG (8-11) (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 10), UAG aktivitelerini sürdürmesi için en küçük UAG fragmenti olarak gösterildi. Burada sağlanan sonuçlar ayrıca UAG fragmentlerinin, UAG'nin (6-13) (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 6) ve siklik UAG'nin (6-13) (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 25), UAG'nin AG seviyelerini azaltabilmesini ve AG/UAG oranını azaltabilmesini sürdürdüğünü göstermektedir.

UAG, bunun fragmentleri ve/veya analogları Prader-Willi Sendromu (PWS) ile ilişkilendirilen yükselmiş AG seviyelerini azaltmak için kullanılmaktadır. PWS'den muzdarip insanlar, yavaşlamış gelişim, şiddetli obezite ve bir doymaz iştah sıkıntıları çekmektedir. Onların açlığı hiperfajinin bir sonucu olarak erken ölümü engellemek için gıda elverişliliğinin koruyucu güçlendirmesini genellikle gerektirecek şekilde güçlüdür. Bu sujelerdeki AG konsantrasyonları normalden daha yüksektir. Hiperfaji ve AG seviyelerindeki artış arasındaki bu korelasyon, AG'nin bilinen oreksijenik etkisi ile uyumludur. Burada mevcut veri, UAG'nin uygulanmasında PWS sujelerinde yükselmiş AG seviyelerini azaltabildiğini göstermektedir. Buluşun UAG fragmentleri, kendi girelin seviyelerini daha normal/sağlıklı seviyelere azaltmak, açlığı

engellemek ve/veya bu rahatsızlığın diğer göstergelerini hafifletmek için Prader-Willi sendromlu hastalara yardımcı olmak için kullanılabilmektedir. AG'deki bu azalmanın, açlıkta ve PWS ile ilişkilendirilen yağ kitlesinde bir sonraki indirgemedede bir azalmaya dönüşmesi beklenmektedir.

5

Burada kullanıldığı gibi, "hiperfaji" terimi, aşırı açlık ve ağzı ile anormal şekilde katıların büyük alınması ifade etmektedir. Hiperfajik durumlar örneğin üçüncü ventrikülün gangliyositoması, hipotalmik astrositoma, Kleine-Levin Sendromu, Froehlich Sendromu, Parkinson Hastalığı gibi merkezi sinir sistemi (CNS) rahatsızlıkları, Prader-Willi Sendromu gibi genetik rahatsızlıklar, endişe, major depresyon rahatsızlığı, bipolar rahatsızlığın depresif fazı, mevsimsel etkili rahatsızlık ve şizofreni gibi major psikiyatrik rahatsızlıklar, delta-9 tetrahidrokannabinol, antidepresanlar ve nöroleptikleri içeren psikotropik medikasyon ve uyku apnesini içeren uyku rahatsızlıkları ile ilişkilendirilerek meydana gelebilmektedir. Hiperfaji, depresyon, endişe ve şizofreni gibi psikiyatrik rahatsızlıklarda

15

meydana gelebilmektedir.

Burada açıklandığı gibi, "tedavi" terimi, hem terapötik tedaviler hem de profilaktik ölçümleri ifade etmektedir. Tedavi ihtiyacında olanlar, rahatsızlığa, hastalığa veya duruma zaten sahip olanlar hatta önlenecek hastalık, rahatsızlık veya duruma sahip koşullakileri içermektedir.

20

Tedavi ihtiyacında olanlar, rahatsızlık, hastalık veya durumun meydana geldiği ve sonraki etkileri veya yaraları bıraktığı kişilerdir. Tedaviler ayrıca, hastalığın, rahatsızlığın veya durumun şiddetinin hafifletilmesi ve tedavi edilmesi için veya hastalığın, rahatsızlığın veya durumun meydana gelmesini veya tekrar oluşmasını önlemek için bir hastalık, bir rahatsızlık veya bir durum ile ilişkilendirilen semptomların geliştirilmesi veya hafifletilmesi, azaltılması için etkili bir terapötik maddenin uygulanması ifade etmektedir.

25

Çalışmalar, obez suşelerde bir diyet indüklenmiş ağrı kaybını takiben bir yıl kadar plazma AG seviyelerinde bir sürekli artış göstermiştir (Refler. 28 ve 29). Bu suşelerdeki yükselmiş AG seviyelerinin azalması suşeye diyetten önce böylece obezite nüksetmesini önleyebilmektedir.

30

Terapötik ve/veya farmasötik kullanımlar için, burada tanımlandığı gibi polipeptidler, sadece bunlarla sınırlanmamak kaydıyla, konvansiyonel yöntemlere göre intravenöz, subkutanöz, transdermal, topikal, oral, bukkal, sublingual, nazal, inhalasyon, pulmoner veya parenteral uygulama için formüle edilebilmektedir. İntravenöz enjeksiyon, bir konvansiyonel periyot üzerinden bolus veya infüzyon ile olabilmektedir. Burada tanımlandığı gibi polipeptidler, örneğin bir içten veya dıştan hedef bölgesine biyolistik taşıma veya bir arterde bir bölgeye

35

kateter ile bir sujede bir hedef bölgeye doğrudan uygulanabilmektedir.

Bir yapılandırmada, burada tanımlanan polipeptidler bir bolus olarak uygulanmaktadır. Buna uygun olarak, bu yapılandırmanın bir uygulamasında, ilaç türevi yemek öncesi bir kapsül olarak uygulanmaktadır burada kapsül etkili bir miktar UAG, bunun bir tuzunun bunun bir fragmenti ve/veya bir analogunu içermektedir. Kapsül günde bir, iki, üç kere veya daha fazla uygulanabilmektedir veya diğer dozaj rejimlerine göre uygulanabilmektedir.

Uygun dozaj rejimleri, sadece bunlarla sınırlanmamak kaydıyla, dozlanan suje türü, yaş, ağrı, cinsiyet ve sujenin medikal durumu, uygulama yolu, istenen etki, vb. gibi teknikte çok iyi bilinen faktörler hesaba katılarak belirlenmektedir.

Burada açığa çıkması gibi polipeptidler gibi aktif bileşenler, bir süspansiyon olarak oral şekilde uygulanabilmektedir ve farmasötik formülasyonun tekniklerinde iyi bilinen tekniklere göre hazırlanabilmektedir ve sadece bunlarla sınırlanmamak kaydıyla, hacmin, bir askıda tutan madde olarak aljinik asit veya sodyum aljinat, bir viskozite geliştirici olarak metilselüloz ve tatlandırıcılar/aroma verici maddelerin uygulanması için mikrokristal selüloz içerebilmektedir. Hazırlanmış tabletleri olarak, bu bileşimler, sadece mikrokristal selüloz ile sınırlanmayacak şekilde dikalsiyum fosfat, nişasta, magnezyum stearat ve laktoz ve/veya diğer ekşiyanlar, bağlayıcılar, katkılar, dağıtıcılar içerebilmektedir. Aktif bileşenler, bir kontrollü-salınım taşıma sistemi yoluyla uygulanabilmektedir.

Nazal aerosol veya inhalasyon formülasyonları tarafından uygulama, tuzlu sudaki çözeltiler olarak hazırlanabilmektedir, biyoyararlanımı geliştirmek için benzil alkol veya diğer uygun koruyucular, absorpsiyon parametrelerini kullanabilmektedir, florokarbonları kullanabilmektedir ve/veya diğer çözdürücü veya dağıtıcı maddeleri kullanabilmektedir.

Buluşun polipeptidleri intravenöz (hem kapsül hem infüzyon), intraperitoneal, subkutanöz, oklüzyon ile veya oklüzyon olmadan topikal veya intramüsküler formda uygulanabilmektedir. Enjeksiyon ile uygulandığında, enjektöre edilebilir çözelti veya süspansiyon, teknikte iyi bilinen, uygun toksik olmayan, parenteral olarak kabul edilebilir sulandırıcılar veya çözücüler kullanılarak formüle edilebilmektedir.

Buluşun polipeptidleri, topikal uygulama için formüle edilebilmektedir. Burada kullanılan gibi "topikal" terim, deri veya mukozal dokuların bileşiklerinin doldurmasına olanak sağlayan uygulamanın herhangi bir yolunu içermektedir.

Topikal uygulama için uygun formülasyon, örneğin, krem, losyon, çözelti, jel, merhem, macun, plaster, boya, biyoyapışkan veya benzerleri formunda olabilmektedir ve/veya lipozomlar, mişelleri, mikropartikülleri ve/veya mikroküreleri içermesi amacıyla hazırlanabilmektedir. Formülasyon, sulu olabilmektedir, yani, su içerebilmektedir veya susuz olabilmektedir ve opsiyonel olarak gövde yüzeyinden buharlaşan nem, gövde yüzeyine ve sonrasında uygulama üzerine formülasyon içinde sürdürülecek şekilde bir tıbbi katman ile birlikte kullanılabilir.

- 10 Farmasötik formülasyon tekniğinde iyi bilindiği gibi merhemler, petrolatum veya diğer petrol türevlerine tipik olarak bağlı preparasyonlardır.

Formülasyonlar lipozomlar, mişeller, mikropartiküller ve/veya mikroküreler ile hazırlanabilmektedir. Lipozomlar bir lipid çiftkatman içeren bir lipid duvara sahip mikroskopik keseciklerdir ve ilaç taşıma sistemleri olarak kullanılabilir. Mişellerin, kendi polar uç grupları bir dizi küresel kabuk oluştururken, hidrofobik, hidrokarbon zincirler bir çekirdek oluşturarak kürenin merkezine doğru yönelecek şekilde düzenlenen yüzey aktif moleküllerden oluştuğu bilinmektedir. Mikropartiküller, genellikle partiküller içinde yakalanan ilaçlar veya aşılarda taşıma sistemleri olarak kullanılabilen polimerler ile normal olarak hazırlanan mikron boyut aralığındaki partikülat taşıma sistemleridir. Mikroküreler, benzer şekilde, mevcut formülasyonlar ve ilaç taşıma sistemleri içine katılabilir. Lipozomlar ve mişeller gibi, mikroküreler büyük oranda bir ilaç veya ilaç içeren formülasyonu kapsayabilmektedir. Mikroküreler genellikle zorunlu olmamasına rağmen sentetik veya doğal olarak oluşan biyouyumlu polimerlerden oluşmaktadır ancak fosfolipidler gibi yüklü lipidlerden de oluşabilmektedir.

Topikal uygulama için uygun formülasyonların preparasyonları teknikte iyi bilinmektedir ve uygun metin ve literatürde açıklanmaktadır.

- 30 Genel olarak, farmasötik bileşimler, teknikte uzman kişiler tarafından iyi bilineceğinden bir farmasötik olarak uygun taşıma ile birlikte buluşun polipeptidlerinin en az birini içerecektir. Bileşimler ayrıca örneğin bir veya daha fazla uygun eksipiyan, sulandırıcı, dolgu maddesi, çözündürücü, koruyucu, taşıma tuz, tamponlama maddesi ve faydalanan dozaj formuna bağlı olarak teknikte iyi bilinen diğer malzemeleri içerebilmektedir. Bileşim yöntemleri teknikte iyi bilinmektedir.

Mevcut metinde, "farmasötik olarak uygun taşıyıcı" terimi ile, *kendiliğinden* herhangi bir teröpatik ve/veya profilatik etkiye sahip olmayan ve toksik olmayan herhangi bir malzemeyi simgelemesi amaçlanmaktadır. Bir farmasötik olarak uygun taşıyıcı kabul edilebilir teknik özelliklere sahip bir farmasötik bileşim elde edilmesini sağlama amacıyla buluşun polipeptidlerine eklenebilmektedir. Bu tür taşıyıcılar örnekleri iyon değiştiriciler, alümina, alüminyum stearat, lesitin, insan serum albümini gibi serum proteinleri, fosfatlar, glisin, sorbik asit, potasyum sorbat gibi tampon maddeleri, doymuş bitkisel yağ asitlerinin kısmi gliserit karışımları su, tuzlar veya protamin sülfat, disodyum hidrojen fosfat, potasyum hidrojen fosfat, sodyum klorür, çinko tuzları koloidal silika, magnezyum trisilikat, polivinil pirolidon, selüloz bazlı maddeler ve PEG gibi elektrolitleri içermektedir.

Polipeptidlerin topikal veya jel bazlı formları için taşıyıcılar sodyum karboksimetilselüloz veya metilselüloz, polivinilpirolidon, poliakrilatlar, polioksietilen-polioksipropilen-blok polimerleri, PEG ve odun vakası alkoller gibi polisakkaritleri içermektedir.

In vivo uygulama için kullanılan polipeptidler steril olmalıdır. Buna, liyofilizasyon ve sulandırma öncesi ve sonrasında steril filtrasyon membranlarından filtreleme ile ulaşabilmektedir. Polipeptidler normal olarak liyofilizlenmiş biçimde veya çözeltide depolanacaktır. Teröpatik polipeptid bileşimleri genel olarak, örneğin bir hipodermik enjeksiyon iğnesi ile bir durdurucu delmeye sahip bir intravenöz çözelti kesesi veya cam şişe gibi bir steril erişim portuna sahip bir konteynirine yerleştirilmektedir.

Buluşun UAG fragmentleri şunları içeren bir imalat ürünü veya bir ticari paket ya da kitte kullanılabilmektedir: bir konteynir, konteynir üzerinde bir etiket, ve belirtilen seviyede kullanılanlarda konteynir içinde bir aktif madde olarak buluşun polipeptidlerini içeren bir bileşim, burada bileşim, *bunlar arasında*, AG'nin modüle edilmesi; AG'nin inhibe edilmesi; dolaşan AG seviyelerinin azalması; dolaşan yükselmiş AG seviyelerinin azalması; dolaşan AG/UAG oranının azalması; dolaşan yükselmiş AG/UAG oranının azalması; AG seviyeleri ve/veya AG/UAG seviyeleri tarafından indüklenen semptomların hafifletilmesi; dolaşan AG ve/veya dolaşan AG/UAG oranıyla ilişkilendirilen durumların kolaylaştırılması; önlenmesi ve/veya tedavi edilmesi ve/veya yükselmiş dolaşan AG ve/veya yükselmiş dolaşan AG/UAG oranıyla ilişkilendirilen durumların kolaylaştırılması; önlenmesi ve/veya tedavi edilmesi için gerçekleştirilmektedir.

Bir "etkili miktar" veya bir "teröpatik olarak etkili miktar", istenen teröpatik sonuca ulaşmak için gerekli zaman periyotları için ve dozajlarda etkili bir miktarı ifade etmektedir. Burada

işaret edilen peptidlerin teröpatik olarak etkili bir miktar hastalığın durumu, yaş, cinsiyet ve birey kilosu ve bireyde istenen bir yan etki bileşiğinin ortaya çıkarabilmesi gibi faktörlere göre değişkenlik gösterebilmektedir. Dozaj rejimleri, ideal teröpatik yan etki sağlamak için ayarlanabilmektedir. Bir teröpatik olarak etkili miktar, bileşiğinin herhangi bir toksik veya zararlı etkisinin teröpatik olarak faydalı etkiler tarafından ağırlaştırılmadığı miktardır. Bir "profilaktik etkili miktar", istenen profilaktik sonuca ulaşmak için, örneğin AG'yi modüle etmek; AG'yi inhibe etmek; dolaşan AG seviyelerini azaltmak; dolaşan yükselmiş AG seviyelerini azaltmak; dolaşan AG/UAG oranını azaltmak; dolaşan yükselmiş AG/UAG oranını azaltmak; AG seviyeleri ve/veya AG/UAG seviyeleri tarafından indüklenen semptomları hafifletmek; dolaşan AG ve/veya dolaşan AG/UAG oranıyla ilişkilendirilen durumları kolaylaştırmak, önlemek ve/veya tedavi etmek ve/veya yükselmiş dolaşan AG ve/veya yükselmiş dolaşan AG/UAG oranıyla ilişkilendirilen koşulları kolaylaştırmak, önlemek ve/veya tedavi etmek için gerekli dozajlarda ve zaman periyotlarında bir etkili miktar ifade etmektedir. Bir profilaktik etkili miktar, teröpatik olarak etkili miktar için yukarıda açıklandığı gibi belirlenebilmektedir. Herhangi bir özel suje için, spesifik doz rejimleri, bileşimlerin uygulanmasını denetleyen veya bunları uygulayan kişinin profesyonel kararı ve birey ihtiyacına göre zamanla ayarlanabilmektedir.

Örneğin, buluşun peptidlerinin bir teröpatik olarak etkili miktarı veya etkili dozu (ayrıca "aktif bileşik" olarak burada ifade edilmektedir) AG'nin modüle edilmesi; AG'nin inhibe edilmesi; dolaşan AG seviyelerinin azalması; dolaşan yükselmiş AG seviyelerinin azalması; dolaşan AG/UAG oranının azalması; dolaşan yükselmiş AG/UAG oranının azalması; AG seviyeleri ve/veya AG/UAG seviyeleri tarafından indüklenen semptomların hafifletilmesi; dolaşan AG ve/veya dolaşan AG/UAG oranıyla ilişkilendirilen koşulların hafifletilmesi, önlenmesi ve/veya tedavi edilmesi ve/veya yükselmiş dolaşan AG ve/veya yükselmiş dolaşan AG/UAG oranıyla ilişkilendirilen koşulların kolaylaştırılmasını önlenmesi ve/veya tedavi edilmesi için yeterli bir miktardır. Bu tür parametrelerin ölçülmesi için yöntemler ve/veya tahliller, teknikte uzman kişiler tarafından bilinmektedir.

Buluşun teröpatik olarak etkili miktarı genellikle yaklaşık 0.001 µ/kg ile yaklaşık 10 mg/kg, daha özellikle yaklaşık 0.01 µ/kg ile yaklaşık 10 mg/kg ve hatta özellikle yaklaşık 1 µ/kg yaklaşık 1 mg/kg arasında değişkenlik gösterecektir. Bu aralığın dışında kalan ancak istenen teröpatik etkiye sahip teröpatik olarak etkili miktarlar veya etkili dozlar, mevcut buluş tarafından kapsanmaktadır.

Bir yapılandırılmada, yukarıda işaret edilen suje, bir memeli, başka bir yönde bir insandır.

Bir başka yapılandırılmada, mevcut polipeptidler, ilave farmakolojik olarak aktif maddeler ile birlikte uygulanabilmektedir veya diğer teröpatik yöntem ile birlikte uygulanabilmektedir. Kombinasyon, bir kısmi kit sistemi formunda olabilmektedir, burada birleştirilen aktif maddeler eşzamanlı olarak veya ayrı uygulama için kullanılabilmektedir.

5

iii) biyoışaretleyiciler olarak AG seviyeleri ve AG/UAG oranı

Diğer yapılandırılmaya göre, mevcut buluş, UAG, bunun bir fragmenti ve/veya bunun bir analogunun bir teröpatik olarak etkili miktarında uygulanması içeren bir tedaviye yanıt olabilen ve/veya bir tedaviden faydalanabilen Prader Willi Sendromu'ndan muzdarip sujelerin belirtilmesi için biyoışaretleyiciler olarak dolaşan AG/UAG oranında kullanılan ve dolaşan AG seviyelerinin kullanımı ile ilgilidir.

Bu yapılandırılmada bir uygulamasında, dolaşan AG seviyeleri ve/veya dolaşan AG/UAG oranı teknikte bilinen yöntemlere göre bir sujeden elde edilen bir kan numunesinde ölçülmektedir. Dolaşan AG seviyesi ve/veya dolaşan AG/UAG'nin oranı daha sonra, sujenin dolaşan AG'nin (yani, bir normal veya sağlıklı seviye altında veya üzerinde) ve/veya dolaşan AG/UAG'nin (yani, bir normal veya sağlıklı oran altında veya üzerinde) bir anormal oranında bir anormal seviyesine sahip olup olmadığı ile ilgili bilgiyi türetmek amacıyla, AG'nin referans dolaşan seviyeleri ve referans dolaşan AG/UAG oranlarına (örneğin, sujenin kendisinden veya kontrol sujelerinin bir popülasyonunda türetilen) bağli olarak kısmen işlenmektedir. Sujenin bir yükselmiş dolaşan AG seviyesi ve/veya bir yükselmiş dolaşan AG/UAG oranına sahip olduğunu taşıyan bir bilgi, sujenin, UAG, bunun bir fragmenti veya bunun bir analogunun uygulanması yanıt verebildiğini göstermektedir. Bu tür sujede UAG'nin, bunun bir fragmentinin veya bunun bir analogunun uygulanması böylece dolaşan AG seviyelerini ve/veya dolaşan AG/UAG oranı azaltabilmektedir hatta yükselmiş dolaşan AG seviyeleri ve yükselmiş dolaşan AG/UAG oranı ile ilişkilendirilen etkileri hafifletebilmektedir.

Bu yapılandırılmada diğer uygulamasında, biyoışaretleyiciler, UAG fragmentinin bir teröpatik olarak etkili miktarında uygulanması yanıt verebilen ve/veya tedaviden faydalanabilen sujelerin bir popülasyonu içinde sujelerin belirtilmesi için kullanılabilmektedir. Bu uygulamada, popülasyon sujeleri Prader-Willi Sendromu'ndan (PWS) seçilmektedir

DENEYLER VE VERİ ANALİZİ

35

Burada sunulan veri, T2DM sujelerinde serum AG seviyeleri ve serum AG/UAG oranı üzerinde

UAG'nin güçlü bir bastırıcı etkisini bildirmektedir.

AG konsantrasyonlarındaki bir çaprazlamalı modelde placeboya karşıki doz UAG'nin (3 µg UAG/kg/sa ve 10 µg UAG/kg/sa) bir sürekli gece boyu (15 saat) infüzyonu, tip 2 diyabetli aşırı kilolu sekiz hastada gerçekleştirildi. Şekil 1, çalışma protokolünün bir şematik temsilini göstermektedir. Glikoz ve insülin yanıtları suşyelerde bir standart kahvaltılık yemeğine (SBM) yanıt vermektedir ve makul metabolik kontroller değerlendirilmiştir. UAG'li infüzyonları sırasında, suşyeler, plasebodan daha fazla yan etkiyi rapor etmemiştir. Laboratuvar değerlendirmeleri, kimyada veya parametrelerde hiçbir önemli değişiklik göstermemiştir ve yan etkiler doza bağlı değildi.

UAG infüzyonu plazma AG seviyelerini azaltmaktadır

Şekiller 2A ve 2B'de sunulan veriler, SMB öncesi ve sonrasında serum AG seviyeleri (Şekil 2A) ve UAG seviyelerindeki (Şekil 2B) değişimleri göstermektedir. SBM başlamadan önce, AG seviyeleri 3 mcg/kg.sa UAG infüzyonu varlığında 3.0 ± 6.7 pg/ml'ye ve 10 mcg/kg.sa UAG infüzyonu varlığında 1.4 ± 3.2 pg/ml'ye placebo infüzyonu sırasında 21.01 ± 8.9 pg/ml'den (ortalama $\pm$ SD) önemli oranda azaltılmaktadır. AG seviyeleri, ayrıca plaseboda SMB'yi takiben 14.03 ± 9.4 pg/ml'den 3 mcg/kg.sa UAG infüzyonu varlığında 0.8 ± 0.8 pg/ml'ye ve 10 mcg/kg.sa UAG infüzyonu varlığında 0.8 ± 1.8 pg/ml'ye düşmüştür (Şekil 2A). Paralel olarak, UAG'nin bir gece infüzyonu, UAG seviyelerinde bir artış ile sonuçlandı (Şekil 2B). UAG seviyeleri placebo infüzyonunda 105.9 ± 31.4 (ortalama $\pm$ SD) pg/ml'den ve 3 mcg/kg.sa UAG infüzyonu varlığında 10998 ± 2623 pg/ml'ye ve 10 mcg/kg.sa UAG infüzyonunun varlığında 12085 ± 1616 pg/ml'ye SBM'nin başlangıcından önce artmıştır. Bu sonuçlar, UAG'nin uygulanması T2DM suşyelerinde serum AG seviyelerini azalttığını göstermektedir.

UAG fragmentinin infüzyonu, AG-indüklenmiş gıda alımını etkisini yok etmektedir

SEKANS KİMLİK NUMARASI: 25'te gösterildiği gibi siklik UAG (6-13) olarak adlandırılan UAG'nin bir düz zincir moleküllerden çember bileşiklere dönüşmüş fragmenti, suşyanlarda AG ile indüklenen oreksijenik etkilerini yok edebilmiştir (Şekil 8). Bu sonuçlar, UAG ile ilgili eylemler/aktivitelerden sorumlu çekirdek sekansını sürdüren, burada açıklandığı gibi UAG fragmentlerinin, AG seviyeleri üzerinde kendi etkilerini sürdürdüğünü göstermektedir. Yukarıda açıklandığı gibi, belirli suşyelerde AG'nin etkilerinin veya bunun seviyelerinin (örneğin, azalan gıda tüketimi) inhibe edilmesinin bir faydası bulunmaktadır. Bu sonuçlar, yükselmiş AG seviyelerinin hiperfaji ile ilişkilendirildiği Prader Willi sendromlu hastaların tedavisinde UAG

için faydalı bir rolü göstermektedir. AG seviyeleri ve/veya biyolojik etkilerin inhibisyonu, böylece azalan iştah ve/veya gıda tüketimi ile sonuçlanmalıdır.

UAG infüzyonu post-prandiyal plazma glikoz seviyelerini azaltmaktadır

5

UAG'nin bir gece infüzyonu, iPro sürekli glikoz izleme ile değerlendirildiği gibi post-prandiyal glikoz seviyelerini önemli derecede azaltmıştır (Şekiller 3A ve 3B). Eğriler altındaki kalan alan plasebo infüzyonu için sırasıyla 3 ve 10 mcg UAG infüzyonları için 1618 mmol/3saatten 1601 mmol/3 saate ve 1540 mmol/3 saate azalmıştır. Şekiller 4A ve 4B, glikoz ön-SBM referans çizgisinden değişiklikler olarak elde edilen sonuçları göstermektedir. Plasebo ile karşılaştırıldığında, eğriler altındaki alan, 3 ve 10 mcg UAG infüzyonu için azalmıştır. Şekiller 5A ve 5B, UAG uygulandığında SBM'den sonra plazma glikoz pikinde bir azalmayı göstermektedir. Post-prandiyal plazma glikoz piklerindeki bir toplam azalma subjelerde gözlemlenebilmektedir (Şekil 5B). Toplamda bu veriler, UAG uygulamasının, T2DM'li subjelerde post-prandiyal plazma glikoz seviyelerini azalttığını göstermektedir.

15

Plazma AG seviyelerinde UAG-indüklenmiş azalma ve AG/UAG oranı glikoz seviyelerinde azalma ile ilişkilidir

Buluş sahipleri, açlık AG seviyeleri ve/veya UAG seviyeleri ve glisemik yanıtı ardından bir standart glikokinaz tahlili kullanılarak UAG uygulaması arasında bir korelasyon varlığını gösterebilmiştir. Bu tür korelasyonunun gösterilmesine istinaden, Şekil 6A, açlık AG seviyeleri yükseldikçe, UAG uygulamasının hipoglisemik etkisinin en iyi olduğunu göstermektedir. Şekil 6B, iPro sürekli glikoz ölçümleri kullanılarak aynı korelasyon ve etkiyi göstermektedir. Açlık AG/UAG oranı ayrıca aşağıdaki UAG uygulamasına glisemik yanıtı ile ilişkilidir (Şekil 6C). Daha yüksek AG/UAG oranları iPro sürekli glikoz ölçümleri kullanılarak UAG infüzyonunun en iyi hipoglisemik etkisi ile ilişkilidir.

25

UAG'nin infüzyonu insülin hassasiyetini geliştirmektedir

30

T2DM subjelerindeki insülin hassasiyeti, Şekil 7A'da gösterildiği gibi hiperinsülinemik-öglisemik yığın protokolü kullanılarak değerlendirildi. 2.5 sa plasebo/UAG infüzyonunun başlangıcında etkili öglisemik insülin yığını alan hastalarda, referans çizgisinden M-indeks değişimi UAG'ye karşı plasebo grubunda ($p=0.02$) %36 arttı (Şekil 7B). Bu sonuçlar, UAG infüzyonunun T2DM subjelerinde insülin direncini geliştirdiğini göstermektedir.

35

Daha kısa UAG infüzyonu plazma AG seviyelerini azaltmada yeterlidir

UAG infüzyonu öncesinde ve ardından 2.5 saat uzunluğundaki UAG infüzyonundan sonra T2DM sujelerinde AG seviyeleri ölçüldü. Şekil 7C'de gösterilen veri, kısalması UAG infüzyon 5 periyodunun plazma AG seviyelerini azaltmada yeterli olduğunu göstermektedir. Şekil 7D, plazma AG seviyelerini azaltmak için kısa bir UAG infüzyon periyodunun yeterli olduğunu gösteren referans çizgisinden AG seviyelerindeki değişiklikleri göstermektedir.

Bu veriler, bunlar arasında, UAG uygulamasında, AG'de bir azalma vasıtasıyla bir SBM 10 sırasında glikoz seviyelerini arttırdığını göstermektedir. Yemekten sonra, pik glikoz seviyelerindeki önemli bir azalma gözlemlendi. UAG infüzyonları düşük ve yüksek dozunun infüzyonu sırasında serum insülin seviyelerinde hiçbir önemli değişim gözlemlenmemiştir (veri gösterilmemektedir), bu da gelişen glisemik kontrolün bir gelişen insülin hassasiyeti ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Veriler, UAG uygulamasında, daha yüksek AG seviyelerinde veya 15 daha yüksek AG/UAG oranında UAG hipoglisemik etkileri daha güçlü yapan bir girelin konsantrasyonuna bağlı şekilde hiperglisemiye geliştirdiğini göstermektedir.

Bu sonuçlar, UAG'nin, metabolik rahatsızlıkların tedavisinde bir girelin inhibitörünün gelişiminde UAG'yi güçlü bir aday yapan girelin seviyelerinin bir etkili inhibitörü olduğunun 20 birinci göstergesidir.

MALZEMELER VE TEKNİK PROTOKOLLER

Çalışma tasarımı Tek merkezli, araştırmacı ile başlatılan, çift kör ve plasebo kontrollü 25 randomize çalışma. Birinci ziyaret tıbbi geçmişi sırasında, subjelerin medikasyon kullanımı ve önemli işaretleri kontrol edildi. Kan numuneleri kimya ve hematoloji analizi için alındı. Çalışma, her iki gün hastanede tedavinin (ziyaret 2, 3 ve 4) üç turundan oluşmaktaydı.

Birinci gün, ortalama olarak öğlen 15:00'da başladı ve ertesi gün öğlen 14:00'a kadar devam 30 etti. Sekiz suje çalışma için 3 gruba ayrıldı. Bu turlar sırasında kullanılan dozajlar, 3 mcg/kg.sa UAG, 10 mcg/kg.sa UAG ya da hastane eczanesi tarafından hazırlanan plasebo/tuzlu su çözeltisiydi ve her suje için 3 kesede taşındı. Ne subjeler ne de araştırmacılar bu aşamalarda verilen ilaçtan haberdardı. Bir haftalık yıkama periyodu, tedavi periyotları arasında gerçekleştirildi.

Çalışmadan önce, çalışma sırasında ve çalışmadan sonra, kan numuneleri AG, UAG, kimya

hematolojisi ve CAC hücreleri için alındı. Glikoz için kan numuneleri, i.v kateter vasıtasıyla alındı. Sürekli glikoz izleme için, bir Sürekli Glikoz ekranı (iPro2, Medtronic trading, Hollanda) sujelerin abdomenine yerleştirildi. Kilo ve kan basıncı her ziyaret sırasında ölçüldü. En az 1 haftalık iyileşme periyodu, tedavi periyotları arasında gerçekleştirildi.

5

Sujeler - (2 kadın ve 6 erkek; ortalama 53 yaşında (31 ila 65 yaş aralığında) 26-36 kg/m² aralığında 31.5 kg/m² vücut kitle indeksine (BMI) sahip, sekiz suje kaydedildi. Sekiz sujenin yedisi günlük olarak metformin kullandı. Tüm sujerler, kayıt öncesinde en az 3 ay için tip 2 diyabet ile teşhis edildi. Görüntüleme öncesi en az 3 ay boyunca metformin monoterapiye olarak sağlandı ancak metformin tedavisi, her tedavi periyodunun başlamasından önce 1 günde durduruldu. Popülasyonda, ortalama glikosile hemoglobin seviyesi (HbA1c) 48 mmol/mol ila 57 mmol/mol (%6.9; aralık %6.5 ila 7.4)) aralığında 52 mmol/mol'dü ve Vücut İndeksi 25 kg/m² idi. Dışlama kriterleri uzun süreli tip 2 diyabet komplikasyonları geçişini veya varlığını içermektedir; görüntülemeye laboratuvar değerlendirmesinde klinik olarak önemli anormallikler, ve görüntüleme öncesi 60 gün içinde sistemik kortikosteroidlerin kullanımı. İnfüzyon öncesinde, sujerler iki kalın kateter aldı. Birinci kateter tedavi öncesinde yerleştirildi ve ikinci kateter kan örnekleme için SBM öncesinde yerleştirildi. İkinci kateter, izotonik tuzlu suyun yavaş infüzyonu tarafından hazırlanmıştır. *Çalışma ilacı* - Bu çalışmada kullanılan UAG, Bachem AG, Hauptstrasse 144, Bubendorf CH-4416, İsviçre tarafından üretildi. UAG, liyofilize toz (5 mg ilaç içeren cam şişeler) olarak taşındı ve imalatçının şartnamelerine göre yerel eczanede depolandı.

10

15

20

Çalışma prosedürleri - İnfüzyonlar, akşam 9 ila sabah 12 arası 15 saat boyunca yerel klinik araştırma biriminde gerçekleştirildi. UAG çözeltisinin her hacmi uygulama için uygun dozu elde etmek için filtrelendi ve %0.9'lu tuzlu su çözeltisinde sulandı. Plasebo tuzlu su çözeltisinin %0.9'unu içermektedir. Doz, sujenin ağırlığına bağlı olarak hesaplandı. Her cam şişe, 0.22 µm filtreden filtrelenen, enjeksiyon için 5 ml su katıldı. Doz daha sonra %0.9 NaCl'nin 500 ml kesesi içine enjekte edildi. Üç kese, 100 ml/saatte bir sürekli 15-saat infüzyonu garanti etmek için hazırlandı.

25

30

Standart kahvaltı yemeği (SBM) şunlardan oluşmaktadır

- 3 dilim beyaz ekmek;
- 3 porsiyon margarin;
- 2 dilim peynir (%48 yağlı)
- 1 porsiyon reçel;

35

- 1 dolu bardak süt; ve
- 1 rafadan yumurta;

toplam 714 kkal (%17 protein, %46 yağ ve %37 karbonhidrat). SBM'nin, akşam 8:00 ila 8:15
 5 arasında 15 dakika içinde tüketilmesi gerekti. 3 ziyaretin her birinde, aşağıdaki güvenlik
 parametreleri değerlendirildi: hemoglobin, hematokrit, platelet sayımı, WBC sayımı, RBC
 sayımı ve diferansiyel ve Sysmex XE 2100, Firma Sysmex, Ecustra 11, 4879 NP Etten-Leur
 kullanılarak belirlendi. AST, ALT, alkalın fosfat, toplam bilirubin, kreatin fosfokinaz (CPK),
 laktat dehidrojenaz (LDH), kreatinin, üre, amilaz, lipaz, ürik asit, glikoz, kolesterol, LDL, HDL,
 10 trigliseritler, sodyum, potasyum, kalsiyum, klorür, protein ve albümin Hitachi Modular P800,
 Roche Transistorstraat 41, 1332 CK Almere kullanılarak belirlenmektedir. Kan glikoz
 seviyeleri, tüm tedavi periyodu boyunca subkutanöz olarak yerleştirilmiş olan bir sürekli glikoz
 izleme cihazı (Medtronic CGMS iPro™ Continuous Glucose Recorder, Medtronic; Hollanda)
 kullanılarak ölçüldü. Serum glikoz seviyeleri (dahili glikokinaz tahlili kullanılarak) her 30
 15 dakikada değerlendirildi ve SBM'den önce başladı ve 4 saat boyunca devam etti. CGMS
 sırasında, tüm sujeler, gün başında en azından dört kapiler slisemik testleri gerçekleştirilmek
 zorunda kaldı. Toplanan veriler, SMBG ve CGMS değerleri arasında korelasyon katsayıları
 elde etmek için CGMS ekranına konuldu. Tüm SMBG testleri, bir sayısal glukometre
 (Contour, Bayer) kullanılarak gerçekleştirildi. AG veya UAG seviyeleri, bir gece infüzyon
 20 başlamadan önce, başlangıçtan önce 10 dakika ve SBM'den sonra 30 dakikada
 değerlendirildi. Girelinin asilasyonunu korumak için, kan numuneleri EDTA tüpleri içinde
 doğrudan toplandı, daha sonra pH 3.0'da 2 dakika içinde 1 ml EDTA-kan tüpü (72 mM NaCl,
 58 mM NaF, 4 mM 4-(2-Aminoetil) benzensülfonil florür hidroklorür (bir suda çözünür,
 tersinmez serin proteaz inhibitörü; AEBSF) üzerinde 1 ml koruyucu çözeltisine eklendi, 295
 25 mOsm/Kg Plazma 4°C'de santrifüj ile hazırlandı, daha sonra 1 ml, 100 µl 1N HCl ile
 asitleştirildi ve tahliller gerçekleştirilene kadar - 80°C'de depolandı.

Girelin tahlili, oda sıcaklığında bir gece boyunca 30 µl/kuyucuklu yakalama antikorunun
 (PBS'de 1 µg/ml'ye sulandırılan D4; anti-C-uçlu girelin (Gutierrez ve ark. 2008 PNAS
 30 105:6320-6325)) inkübasyon ile kaplanan MSD ELISA 96-kuyucuklu plakalar (Meso Scale
 Discovery (MSD), Gaithersburg, MD, ABD) kullanıldı. Yakalama antikoru kaldırıldı ve
 kuyucuklar çalkalama ile oda sıcaklığında 1 sa boyunca 150 µl kazein tamponu (Pierce) ile
 blokladı. AG ve UAG için standartlar, sırasıyla, 8 ng/ml ve 30 ng/ml'de başlayan kazein
 tamponunda sekiz 4x seri sulandırma kullanılarak hazırlandı. Korunan plazma kazein
 35 tamponunda 1:1 olarak sulandırıldı. Ayrı plakalar AG ve UAG tespiti için kullanıldı. Standartlar
 ve numuneler (25 µl/kuyucuk) kaplanmış ELISA plakalar üzerinde yüklendi ve 3x PBS-T (150

µl/kuyucuk) ile yıkanmış, 2 saat boyunca çalkalama ile oda sıcaklığında inkübe edildi. C2-4a1 ve E8 tespit antikorları (sırasıyla, N-uçlu AG ve N-uçlu UAG) MSD'nin standart protokolü kullanılarak sülofetiketlendi. Daha sonra 0.2X kazein/%0.05 Tween 20'de 1:10000 sulandırıldı ve sırasıyla 25µl/kuyucukta AG veya UAG plakalarına eklendi. Plakalar çalkalama ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Plakalar üç kere PBS-T (150 µl/kuyucuk) ile yıkanıldı. Son olarak, 150 µl 1X Read Tamponu (MSD), her kuyucuğa eklendi ve plakalar bir MSD Kesit Görüntüleyici 6000 üzerinde hemen okundu. Numunler için AG veya UAG değerleri Kesit Görüntüleyici yazılımı kullanılarak ilgili standart eğimlerden interpolasyon ile hesaplandı.

10 *Yığın çalışması* - Randomize 2-periyotlu, 2-tedavili, 2.5 sa boyunca sürekli iv infüzyon ile uygulanan UAG'nin bir dozunun (10 µg/kg/sa) değerlendirilmesiyle UAG'ye karşı araç infüzyonun çift kör çalışması. 2.5 sa plasebo/UAG infüzyonunun başlangıcında etkili öglisemik insülin yığılan hastalarda.

15 *İstatistiksel analizler* - Veri analizleri, Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA 92037 ABD) ile gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama (±SE) olarak verilmektedir. Karşılaştırmalar, Bonferroni'nin Çoklu Karşılaştırmalar Wilcoxon uyumlu-çiftler eşleştirilmiş dizi testleri ve ANOVA analizleri kullanılarak hesaplandı.

20 Şekil 8'de sunulan deney verisine göre, 275g ve 300g ağırlığındaki 7 haftalık Sprague-Dawley sıçanlar, *istenildiği kadar* bir pelet diyeti beslendi ve yalnızca plastik kafeste barındırıldı. Deney, serbest olarak beslenen sıçanlarda sıkı döngüsünün başlangıcından sonra 2.5 saatte gerçekleştirildi. Oranlar eşzamanlı olarak vehikül artı vehikül, vehikül + AG (13 µg/kg) veya düz zincir moleküllerden çember bileşiklere dönüşen UAG (6-13) (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 25) (42 µg/kg) + AG (13 µg/kg) ile i.p. enjekte edildi. Sıçanlarda i.p. enjeksiyonun tamamlanmasından hemen sonra, *gece istenildiği kadar* gıda kaldırıldı ve kafes üzerine yerleştirilen, daha önceden tartılan her hayvan için 2 pelet ile yer değiştirildi. Gıda alımı her zaman aralığında (30 dk, 1 sa ve 2 sa) besleme periyodu öncesinde ve sonrasındaki gıda ağırlığı arasındaki fark olarak hesaplandı. Kümülatif gıda alımı farklı zaman periyotlarındaki değerlerini toplayarak hesaplandı.

35 Buluş, bunların spesifik yapılandırılmaları ile bağlantı olarak açıklanmasında rağmen, diğer modifikasyonlar yapabildiği anlaşılabilecek ve bu başvurunun, buluşun uygun olduğu teknikte bilinen veya alışılmış uygulamaya girdiği gibi ve burada önceden ortaya konan önemli özelliklere uygulanabilmesi gibi ve ekli istemlerin kapsamında aşağıda belirtildiği gibi genel olarak, buluşun prensiplerini takiben ve mevcut buluştan bu tür ayrılmalar çıkararak herhangi

bir varyasyonu, kullanılmıveya adaptasyonlarınkapsamasıamaçlanmaktadır

REFERANS LİSTESİ

- 5 1.Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H and. Kangawa K; Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach, *Nature* 402:656-660 (1999).
- 2.Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB and Korbonits M; The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 10 87:2988-2991 (2002).
- 3.Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PL, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee K-K, Pong S-S, Chaung L-Y, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji D, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JA, Smith RG, Van der Ploeg LHT; A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-977 (1996).
- 4.Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K.; Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines 20 plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* Ekim;86(10):4753-8 (2001)
- 5.Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123(4):1120-1128, 2002.
- 25 6.Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762):656-660, 1999.
- 7.Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407(6806):908-913, 2000.
- 8.Broglio F, Gianotti L, Destefanis S, Fassino S, Abbate Daga G, Mondelli V, Lanfranco F, Gottero C, Gauna C, Hofland L, Van Der Lely AJ, Ghigo E. The endocrine response to acute ghrelin administration is blunted in patients with anorexia nervosa, a ghrelin hypersecretory state. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60(5):592-599, 2004.
- 30 9.Tong J, Prigeon RL, Davis HW, Bidlingmaier M, Kahn SE, Cummings DE, Tschöp MH, D'Alessio D. Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes* Eylül;59(9):2145-51 (2010).
- 35 10.Cummings DE, Clement K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, Schwartz MW,

Basdevant A, Weigle DS. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med* 8(7):643-644 (2002).

11.Haqq AMF, Farooqi IS, O'Rahilly S, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, Lafranchi SH, Purnell JQ. Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88(1):174-178 (2003).

12.Mifune H, Nishi Y, Tajiri Y, Masuyama T, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M. Increased production of active ghrelin is relevant to hyperphagia in nonobese spontaneously diabetic Torii rats. *Metabolism*. 2011 Ekim 14. [Yazdırman öncesinde epub]

13.Misra M, Miller KK, Kuo K, Griffin K, Stewart V, Hunter E, Herzog DB, Klibanski A. Secretory dynamics of ghrelin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(2):E347-E356 (2005).

14.Nikolopoulos D, Theocharis S, Kouraklis G. Ghrelin: a potential therapeutic target for cancer. *Regul Pept* 163(1-3):7-17 (2010).

15.van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E; Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25:426-457 (2004).

16.Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*. Ocak;54(1):18-24 (2005).

17.Zhang W, Chai B, Li JY, Wang H, Mulholland MW. Effect of des-acyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology*. Eylül;149(9):4710-6. (2008)

18.Broglio F, Gottero C, Prodham F, Gauna C, Muccioli G, Papotti M, Abribat T, Van Der Lely AJ, Ghigo E. Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. Haziran;89(6):3062-5 (2004).

19.Gauna C, Meyler FM, Janssen JA, Delhanty PJ, Abribat T, van Koetsveld P, Hofland LJ, Broglio F, Ghigo E, van der Lely AJ. Administration of acylated ghrelin reduces insulin sensitivity, whereas the combination of acylated plus unacylated ghrelin strongly improves insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. Ekim;89(10):5035-42 (2004).

20.St-Pierre DH, Karelis AD, Coderre L, Malita F, Fontaine J, Mignault D, Brochu M, Bastard JP, Cianflone K, Doucet E, Imbeault P, Rabasa-Lhoret R. Association of acylated and nonacylated ghrelin with insulin sensitivity in overweight and obese postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. Ocak;92(1):264-9 (2007).

21.Pacifico L, Poggiogalle E, Costantino F, Anania C, Ferraro F, Chiarelli F, Chiesa. Acylated and nonacylated ghrelin levels and their associations with insulin resistance in

obese and normal weight children with metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol.* Aralık;161(6):861-70 (2009).

22.Barazzoni R, Zanetti M, Ferreira C, Vinci P, Pirulli A, Mucci M, Dore F, Fonda M, Ciocchi B, Cattin L, Guarnieri G. Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* Ekim;92(10):3935-40 (2007).

23.Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Gil MJ, Becerril S, Sáinz N, Silva C, Salvador J, Colina I, Frühbeck G. Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int J Obes (Lond).* Mayıs;33(5):541-52 (2009).

24.Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Lean mean fat reducing "ghrelin" machine: Hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *Neuropharmacology* 58(1):2-19 (2010).

25.Gualillo O, Lago F, Dieguez C. Introducing GOAT: a target for obesity and anti-diabetic drugs? *Trends Pharmacol Sci* 29(8):398-401 (2008).

26. Hillman JB, Tong J, Tschop M. Ghrelin biology and its role in weight-related disorders. *Discov Med.* Haziran;11(61):521-8 (2011).

27.Kumar R, Salehi A, Rehfeld JF, Höglund P, Lindström E, Håkanson R. Proghrelin peptides: Desacyl ghrelin is a powerful inhibitor of acylated ghrelin, likely to impair physiological effects of acyl ghrelin but not of obestatin A study of pancreatic polypeptide secretion from mouse islets. *Regul Pept.* Eylül 24;164(2-3):65-70 (2010)

28.Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med.* Mayıs;346(21):1623-30 (2002).

29.Sumithran P, Prendergast LA, Delbridge E, Purcell K, Shulkes A, Kriketos A, Proietto J. Long-term persistence of hormonal adaptations to weight loss. *N Engl J Med.* Ekim 27;365(17):1597-604 (2011).

30.Kiewiet RM, van Aken MO, van der Weerd K, Uitterlinden P, Themmen AP, Hofland LJ, de Rijke YB, Delhanty PJ, Ghigo E, Abribat T, van der Lely AJ. Effects of acute administration of acylated and unacylated ghrelin on glucose and insulin concentrations in morbidly obese subjects without overt diabetes. *Eur J Endocrinol* 161:567-573 (2009).

31.Gauna C, Delhanty PJD, Hofland LJ, Janssen J, Broglio F, Ross RJM, Ghigo E, van der Lely AJ. Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90:1055-1060 (2005).

32.Gauna C, Kiewiet RM, Janssen JA, van de Zande B, Delhanty PJ, Ghigo E, Hofland LJ, Themmen AP, van der Lely AJ. Unacylated ghrelin acts as a potent insulin secretagogue in

glucose-stimulated conditions. Am J Physiol Endocrinol Metab 293:E697-704 (2007).

33.Granata R, Settanni F, Gallo D, Trovato L, Biancone L, Cantaluppi V, Nano R, Annunziata M, Campiglia P, Arnoletti E, Ghe C, Volante M, Papotti M, Muccioli G, Ghigo E. Obestatin promotes survival of pancreatic beta-cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of beta-cell mass and function. Diabetes 57:967-979 (2008).

34.Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Govek EK, McDonagh T, Qi Y, DiStefano PS, Geddes BJ. Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. Regul Pept 150:55-61 (2008).

35.Nonogaki K, Nozue K, Oka Y. Hyperphagia alters expression of hypothalamic 5-HT2C and 5-HT1B receptor genes and plasma des-acyl ghrelin levels in Ay mice. Endocrinology 147:5893-5900 (2006).

36.Kitamura S, Yokota I, Hosoda H, Kotani Y, Matsuda J, Naito E, Ito M, Kangawa K, Kuroda Y. Ghrelin concentration in cord and neonatal blood: relation to fetal growth and energy balance. J Clin Endocrinol Metab. 2003 Kasım;88(11):5473-7.

SEKANS LİSTESİ

<110> ALIZE PHARMA SAS Aart Jan van der Lely Thierry Aribat

<120> ASİLENMEMİŞ GİRELİN KULLANILARAK GİRELİN SEVİYELERİ VE GİRELİN/ASİLENMEMİŞ GİRELİN ORANININ MODÜLASYONU

<130> D31874

<150> 61/576,217

<151> 2011-12-15

<160> 30

<170> PatentIn versiyon 3.5

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

<400> 1

Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Arg	Val	Gln	Gln	Arg	Lys
1				5					10					15	
Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu	Gln	Pro	Arg				
			20					25							

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

<400> 2

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Gl u Hi s Gl n Arg Val Gl n Gl n
1 5 10

5

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

10

<400> 3

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Gl u Hi s Gl n Arg Val Gl n Gl n Arg Lys
1 5 10 15
Gl u Ser

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

15

<400> 4

Gly Ser Ser Phe Leu
1 5

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

20

<213> Homo sapiyenler

<400> 5

Gl u Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gl n Pro Arg
1 5 10

25

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

<400> 6

Ser Pro Gl u Hi s Gl n Arg Val Gl n
1 5

30

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

35

<400> 7

Gl u Hi s Gl n Arg Val Gl n
1 5

	<210> 8 <211> 5 <212> PRT <213> Homo sapiyenler
5	<400> 8 G l u H i s G l n A r g V a l 1 5
10	<210> 9 <211> 13 <212> PRT <213> Homo sapiyenler <400> 9 S e r P r o G l u H i s G l n A r g V a l G l n G l n A r g L y s G l u S e r 1 5 10
15	<210> 10 <211> 4 <212> PRT <213> Homo sapiyenler <400> 10 G l u H i s G l n A r g 1
20	<210> 11 <211> 4 <212> PRT

<213> Homo sapiyenler

<400> 11

Hi s Gl n Arg Val
1

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

<400> 12

Se Pro Asp Hi s Gl n Arg Val Gl n
1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

<400> 13

Ser Pro Gl u Hi s Gl n Lys Val Gl n
1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

<400> 14

Gl y Pro Gl u Hi s Gl n Arg Val Gl n
1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

<400> 15

Al a Pro Gl u Hi s Gl n Arg Val Gl n
1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

<400> 16

Ser Ala Glu His Gln Arg Val Gln
1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiyenler

<400> 17

Ser Pro Ala His Gln Arg Val Gln
1 5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiyenler

<400> 18

Ser Pro Glu Ala Gln Arg Val Gln
1 5

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiyenler

<400> 19

Ser Pro Glu His Ala Arg Val Gln
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiyenler

<400> 20

Ser Pro Glu His Gln Ala Val Gln
1 5

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiyenler

<400> 21

Ser Pro Glu His Gln Arg Ala Gln
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Ser Pro Glu His Gln Arg Val Ala
1 5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ASETİLENME

<400> 23

Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln
1 5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ASETİLENME

<220>

<221> MİSK_ÖZELLİĞİ

<222> (2)..(2)

<223> D-amino asit

<400> 24

Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln
1 5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiyenler

<220>

<221> MİSK_ÖZELLİĞİ

<222> (1)..(8)

<223> Sıklık

<400> 25

Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln
1 5

	<210> 26	
	<211> 8	
	<212> PRT	
5	<213> Homo sapiyenler	
	<220>	
	<221> MİSK_ÖZELLİĞİ	
	<222> (3)..(6)	
	<223> Sıklık	
10	<400> 26	
		Ser Pro Glu His Gl n Lys Val Gl n
		1 5
	<210> 27	
	<211> 8	
	<212> PRT	
15	<213> Homo sapiyenler	
	<220>	
	<221> MOD_RES	
	<222> (1)..(1)	
	<223> ASETİLENME	
20	<220>	
	<221> MİSK_ÖZELLİĞİ	
	<222> (3)..(6)	
	<223> Sıklık	
	<400> 27	
25		
		Ser Pro Glu His Gl n Lys Val Gl n
		1 5
	<210> 28	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> Homo sapiyenler	
30	<220>	
	<221> MOD_RES	
	<222> (1)..(1)	
	<223> ASETİLENME	
	<400> 28	
35		
		Ser Pro Glu His Gl n Lys Val Gl n
		1 5

<210> 29
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiyenler

5 <400> 29

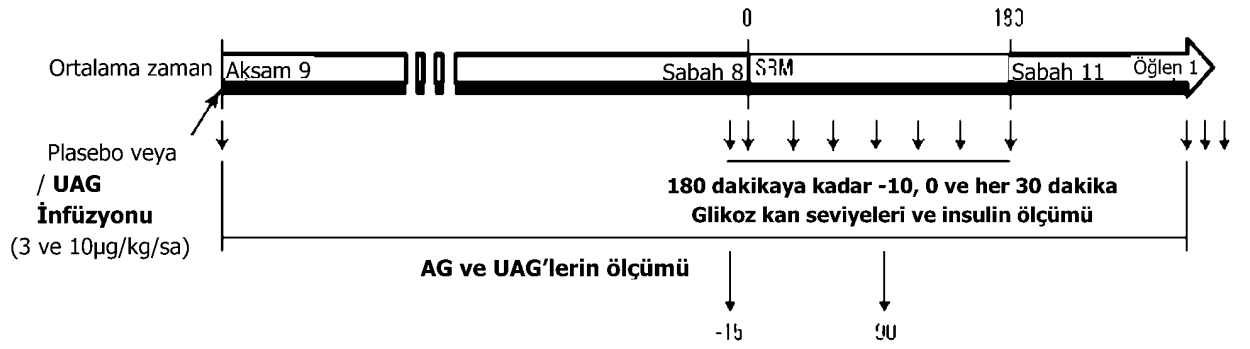
Hi s Gl n Arg
1

10 <210> 30
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiyenler

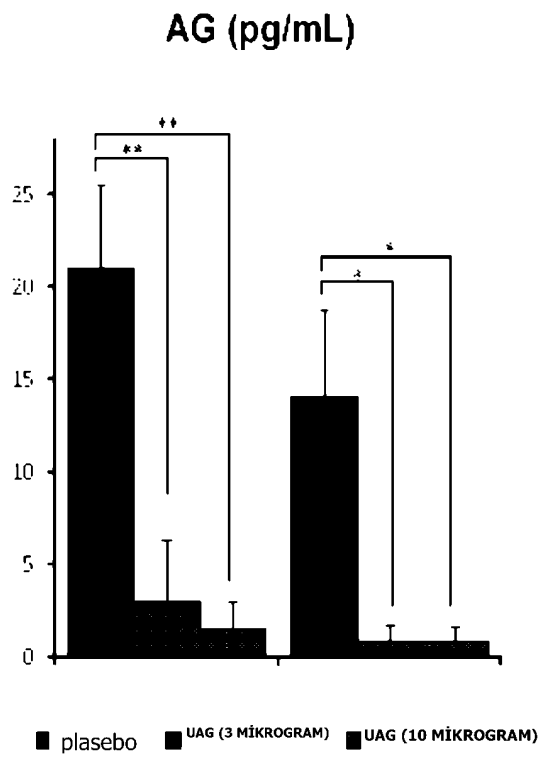
<400> 30

Gln Gl n Val Arg Gl n Hi s Gl u Pro Ser Leu Phe Ser Ser Gly
1 5 10

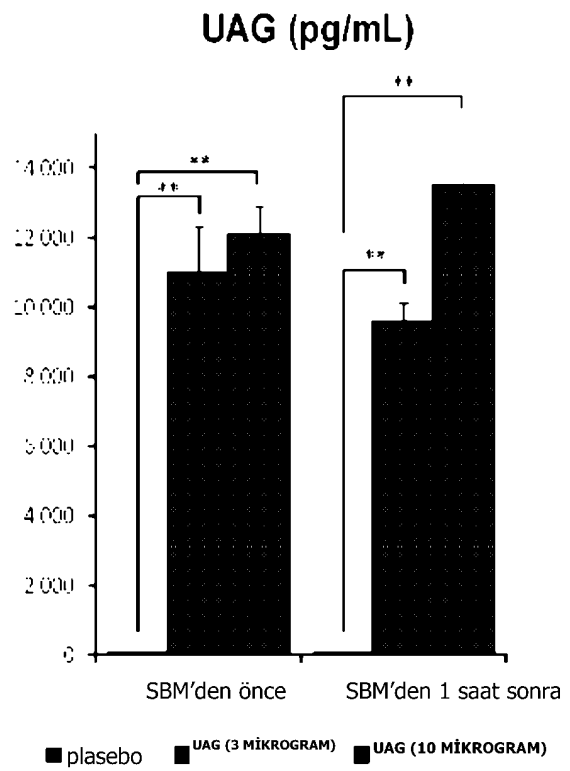
15



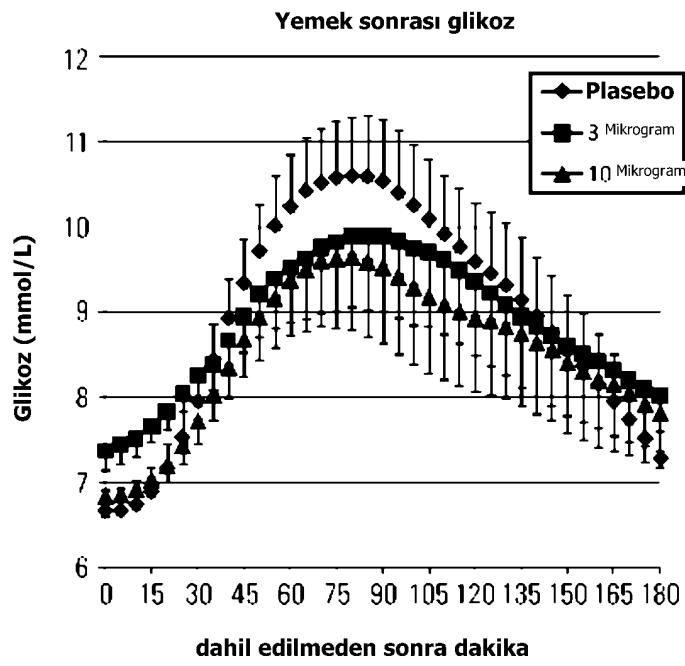
ŞEKİL 1



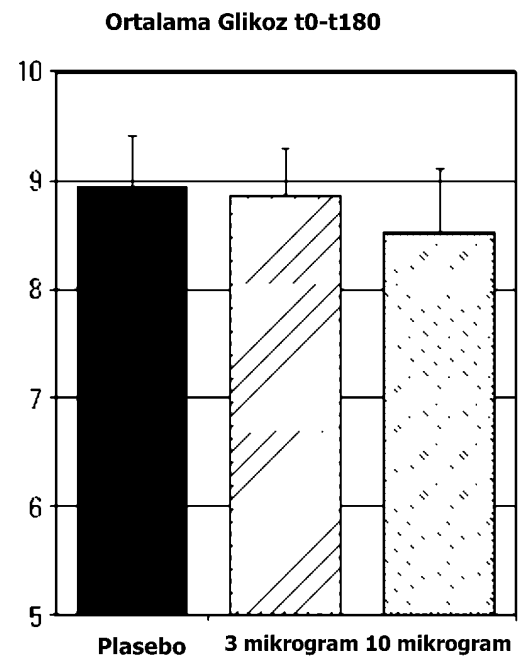
ŞEKİL 2A



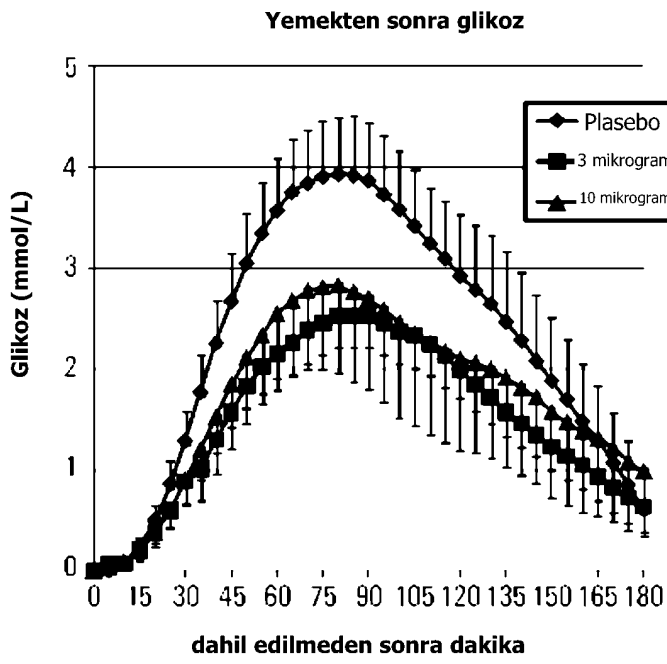
ŞEKİL 2B



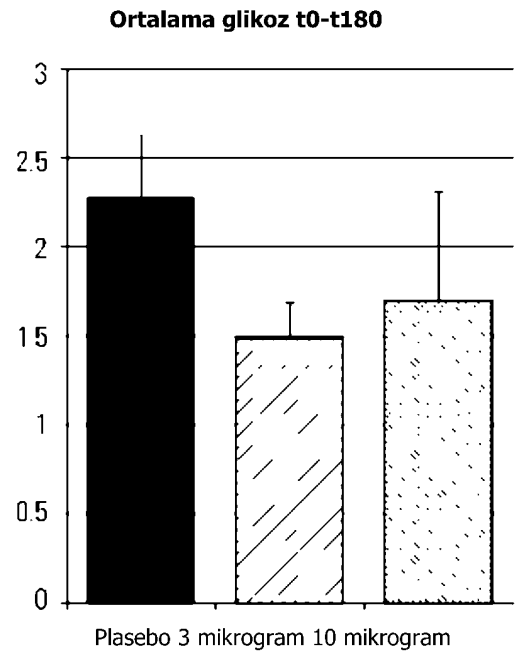
ŞEKİL 3A



ŞEKİL 3B

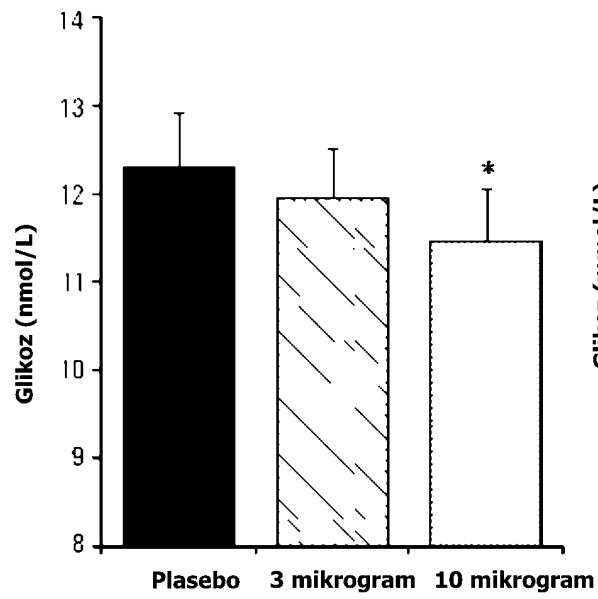


ŞEKİL 4A



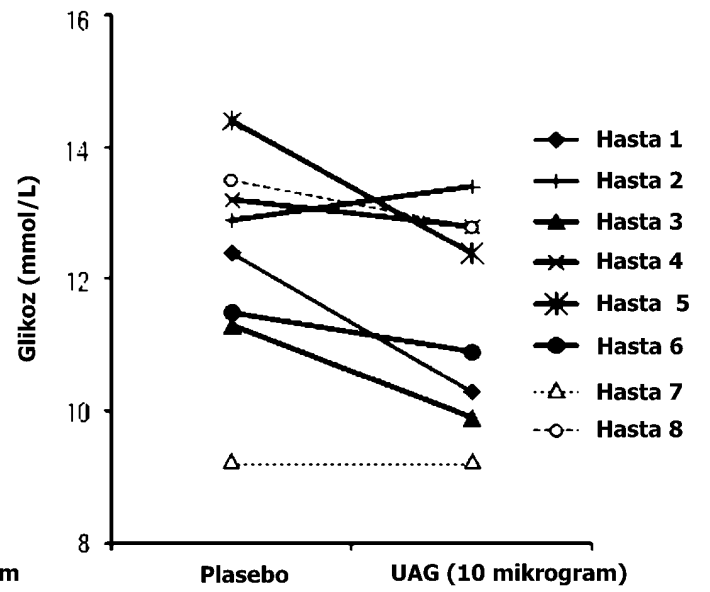
ŞEKİL 4B

SBM'den sonra glikoz piki

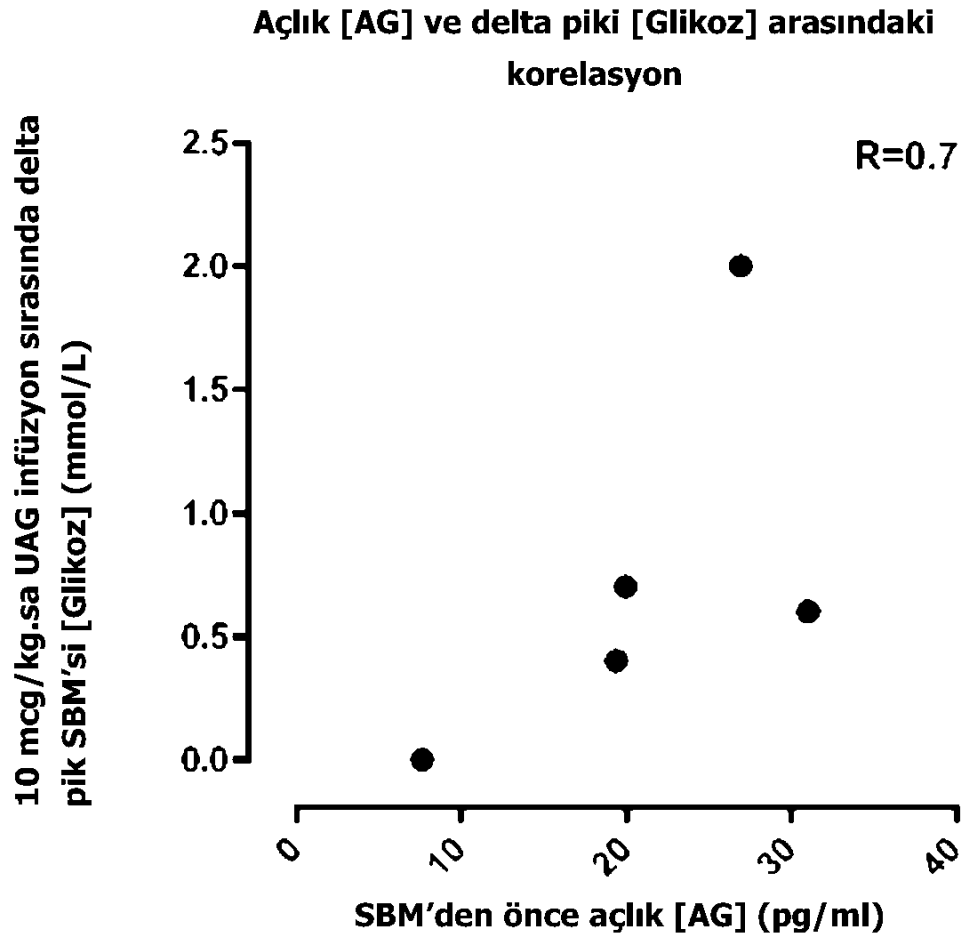


ŞEKİL 5A

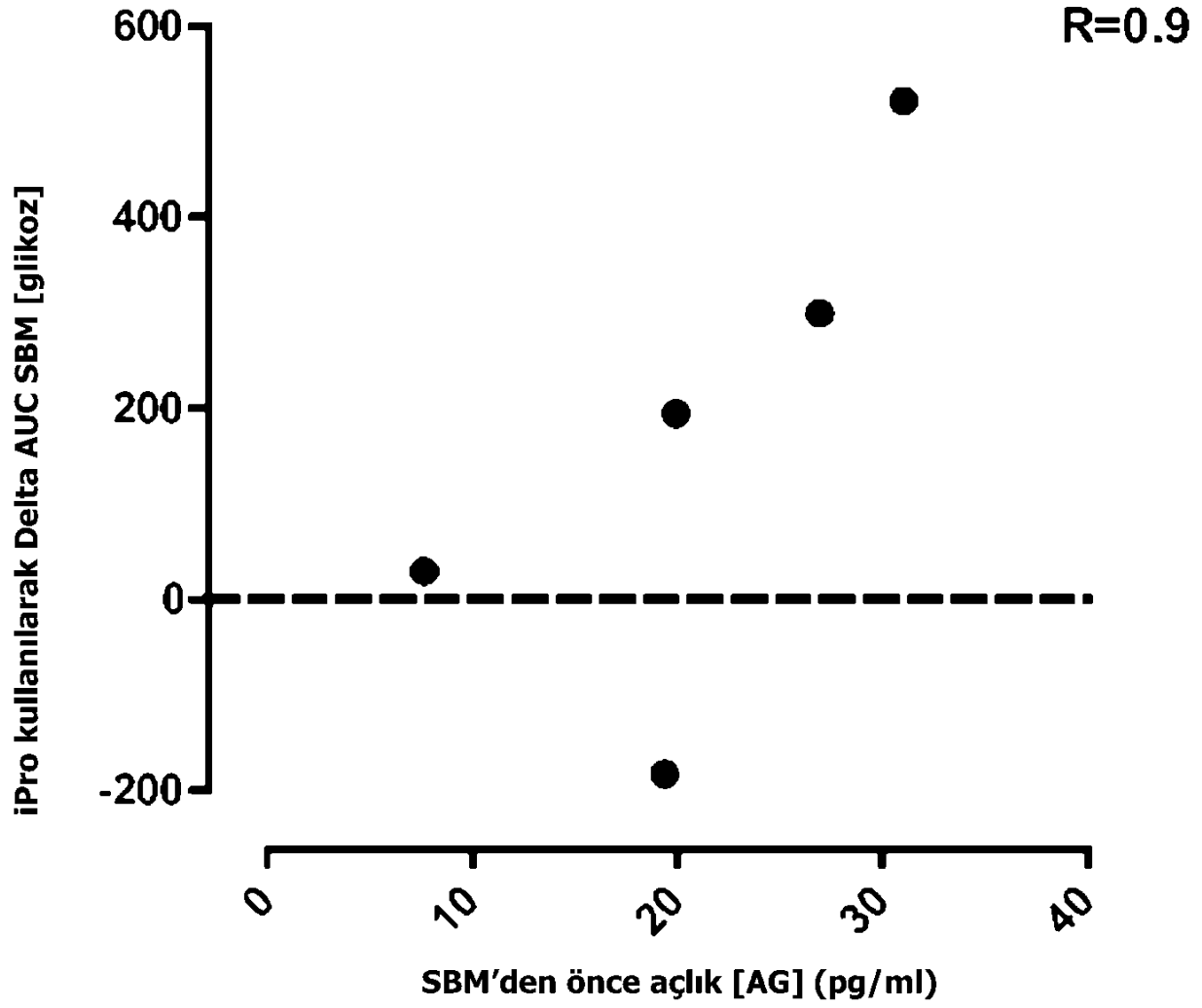
SBM'den sonra glikoz piki



ŞEKİL 5B

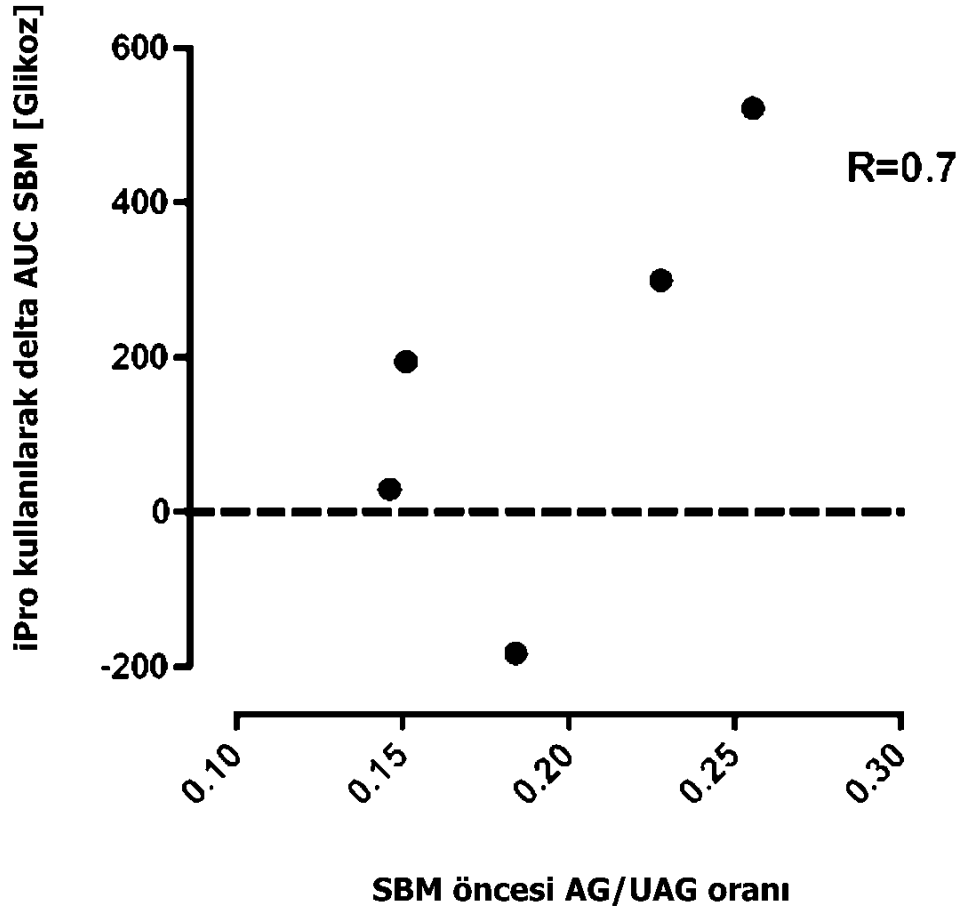
**ŞEKİL 6A**

iPro kullanılarak açlık [AG] ve delta AUC [Glikoz] arasındaki
korelasyon

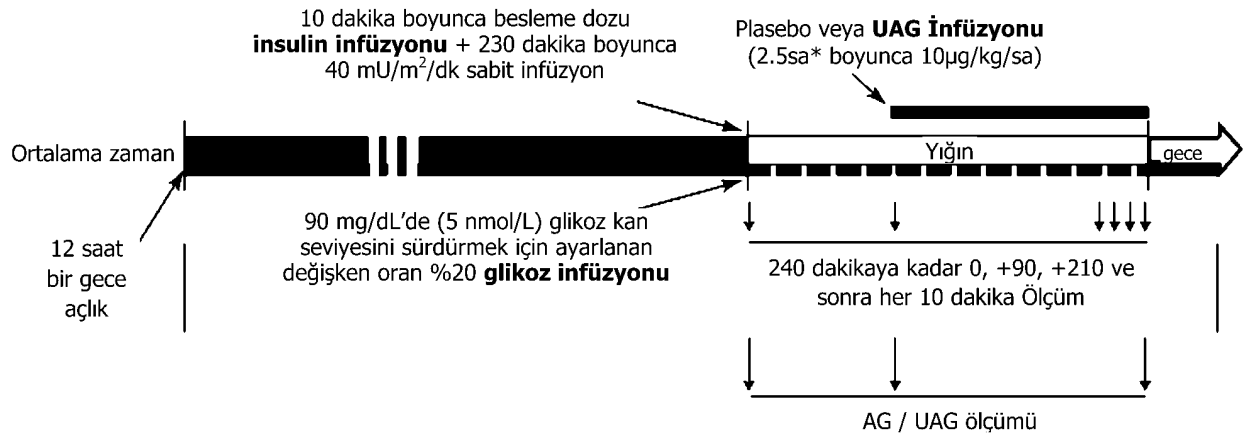


ŞEKİL 6B

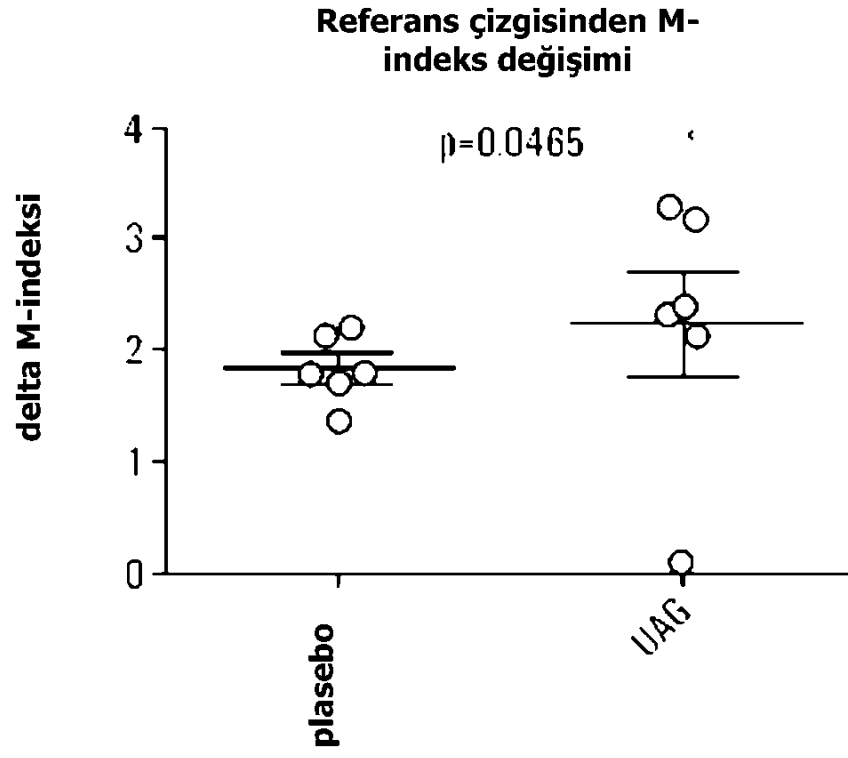
iPro kullanılarak açlık AG/UAG oranı ve delta AUC [Glikoz] arasındaki korelasyon

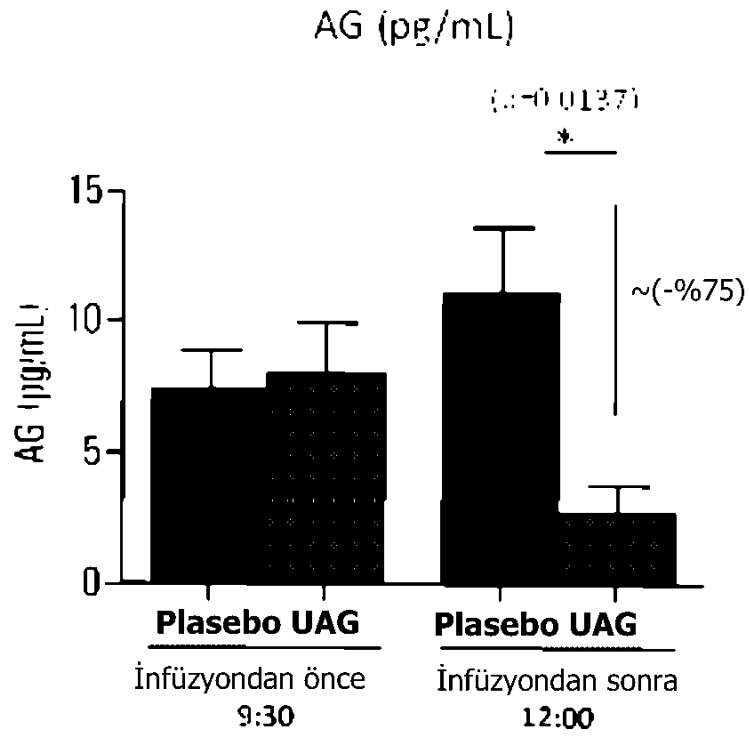


Şekil 6C

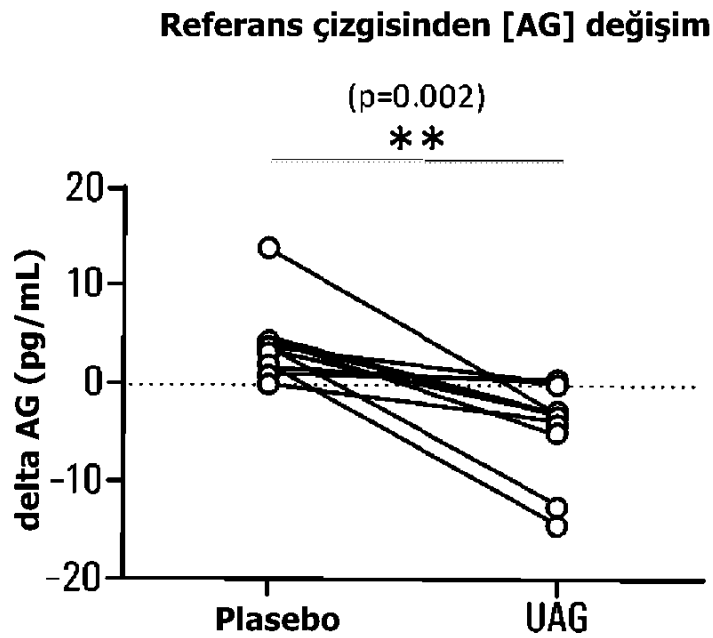


ŞEKİL 7A

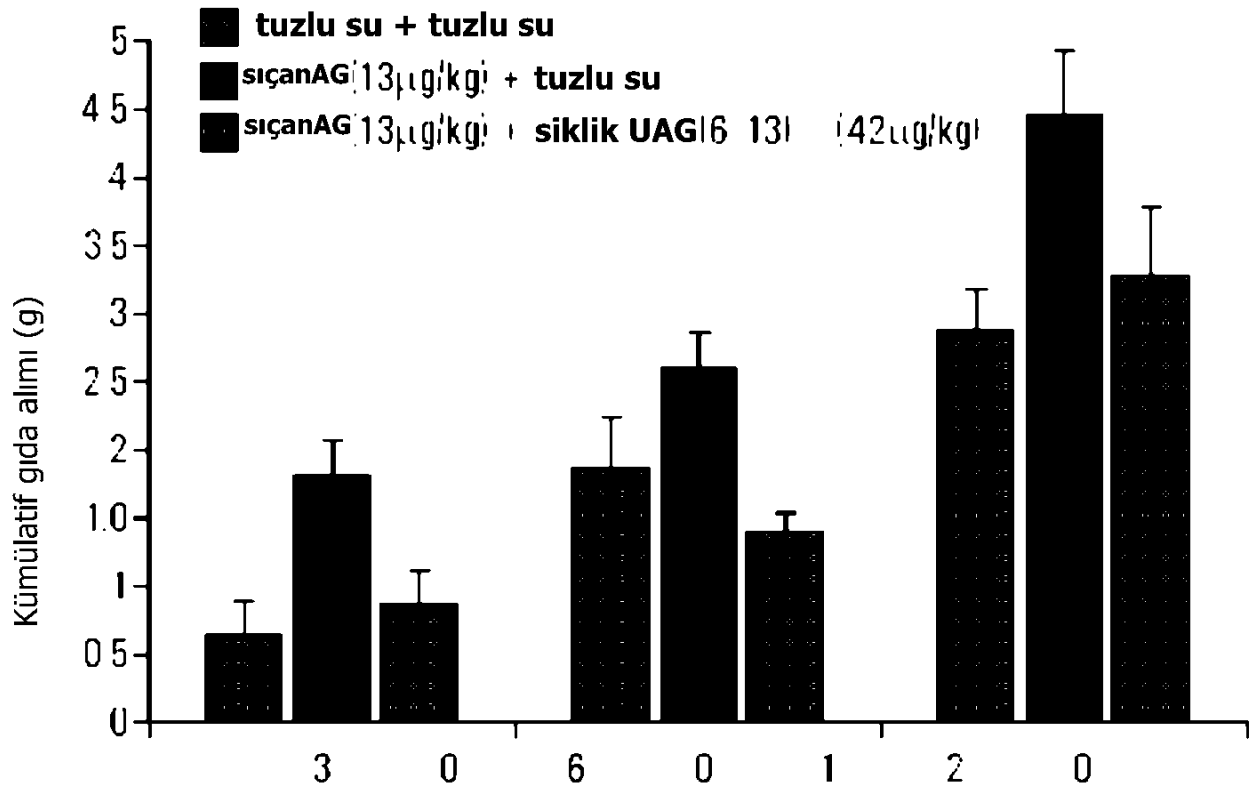
**ŞEKİL 7B**



ŞEKİL 7C



ŞEKİL 7D



ŞEKİL 8