



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2008138561/15, 23.02.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
23.02.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
28.02.2006 CU 2006-048

(43) Дата публикации заявки: 10.04.2010 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 10.11.2012 Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: WO 2004096260 A1, 08.03.2006. RU  
2005106236 A, 20.01.2006. EA 6484 B1,  
29.12.2005. EP 1354597 B1, 17.08.2005.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 29.09.2008(86) Заявка РСТ:  
CU 2007/000005 (23.02.2007)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2007/098715 (07.09.2007)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городиский и  
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517

(72) Автор(ы):

БЕРЛАНГА АКОСТА Хорхе (CU),  
СИБРИАН ВЕРА Данай (CU),  
ГАРСИЯ ДЕЛЬ БАРКО ЭРРЕРА  
Диана (CU),  
ГИЛЬБЕН НЬЕТО Херардо Энрике (CU),  
СУАРЕС АЛЬБА Хосе (CU),  
ЛОПЕС МОЛА Эрнесто (CU),  
СЕЛЬМАН-ОУСЕЙН СОСА Мануэль (CU),  
ВАСКЕС КАСТИЛЬО Мариэла (CU)

(73) Патентообладатель(и):

СЕНТРО ДЕ ИНХЕНЬЕРИЯ ХЕНЕТИКА  
И БИОТЕКНОЛОХИЯ (CU)**(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ GHRP-6, ДЛЯ  
ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ И УСТРАНЕНИЯ ФИБРОЗА И ДРУГИХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ  
ОТЛОЖЕНИЙ В ТКАНЯХ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине, в частности к применению стимулирующего секрецию пептида GHRP-6, который многократно вводят в составе фармацевтической композиции, которая предотвращает и устраняет отложение патологического фиброзного материала в паренхиматозных тканях внутренних органов, таких как печень, легкие, пищевод, тонкий кишечник, почки, кровеносные сосуды, суставы, и другие системные формы кожного

фиброза любого этиопатогенеза. Кроме того, этот пептид предотвращает и устраняет отложение амилоидного и гиалинового материала в любых своих соответствующих химических формах и типах тканей, среди прочего, в мозге, мозжечке, кровеносных сосудах, печени, кишечнике, почках, селезенке, поджелудочной железе, суставах и коже. Таким образом, корректирует клеточные, тканевые и органые дисфункции, вызванные этими отложениями. Пептид по настоящему изобретению наносят инфльтрацией или

местно, внося вклад в предотвращение и устранение келоидов и гипертрофических рубцов в коже, возникающих как следствие ожогов и другой травмы кожи. Группа изобретений обеспечивает быстрое уменьшение избыточного количества коллагенового

материала и внеклеточного матрикса, устранение патологических отложений фиброзного материала в паренхиматозных внутренних тканях. 5 н. и 21 з.п. ф-лы, 7 пр., 19 табл., 1 ил.

R U 2 4 6 5 9 1 3 C 2

R U 2 4 6 5 9 1 3 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
**A61K 38/08** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2008138561/15, 23.02.2007**

(24) Effective date for property rights:  
**23.02.2007**

Priority:

(30) Convention priority:  
**28.02.2006 CU 2006-048**

(43) Application published: **10.04.2010 Bull. 10**

(45) Date of publication: **10.11.2012 Bull. 31**

(85) Commencement of national phase: **29.09.2008**

(86) PCT application:  
**CU 2007/000005 (23.02.2007)**

(87) PCT publication:  
**WO 2007/098715 (07.09.2007)**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO  
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",  
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517**

(72) Inventor(s):

**BERLANGA AKOSTA Khorkhe (CU),  
SIBRIAN VERA Danaj (CU),  
GARSIIa DEL' BARKO EhRRERA Diana (CU),  
GIL'EN N'ETO Kherardo Ehnrike (CU),  
SUARES AL'BA Khose (CU),  
LOPES MOLA Ehrnesto (CU),  
SEL'MAN-OUSEJN SOSA Manuehl' (CU),  
VASKES KASTIL'O Mariehla (CU)**

(73) Proprietor(s):

**SENTRO DE INKhEN'ERIIa KhENETIKA I  
BIOTEKNOLOKhIIa (CU)**

(54) **GHRP-6-CONTAINING PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION AND REMOVAL OF FIBROSIS AND OTHER PATHOLOGICAL DEPOSITS IN TISSUES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions relates to medicine, in particular, to application of secretion-stimulating peptide GHRP-6, which is repeatedly introduced in composition of pharmaceutical composition, which prevents and removes deposits of pathological fibrous material in parenchymatous tissues of internal organs, such as liver, lungs, esophagus, small intestine, kidneys, blood vessels, joints, and other system forms of skin fibrosis of any etiopathogenesis. In addition, said peptide prevents and removes deposits of amyloid and hyaline material in any their forms and types of

tissues, including, in brain, cerebellum, blood vessels, liver, intestine, kidneys, pancreas, joints and skin. Thus, it corrects cellular, tissue and organ dysfunctions, caused by said deposits. Peptide, in accordance with claimed invention, is applied by infiltration or locally, contributing to prevention and removal of keloids and hypertrophic scars in skin, resulting from burns and other skin trauma.

EFFECT: group of inventions ensures fast reduction of excessive amount of collagen material and extracellular matrix, removal of pathological deposits of fibrous material in parenchymatous internal tissues.

26 cl, 7 ex, 19 tbl, 1 dwg

RU 2 465 913 C2

RU 2 465 913 C2

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области фармацевтической промышленности и медицины и более конкретно к применению пептидов, стимулирующих секрецию, которые многократно вводят в фармацевтической композиции для предотвращения и устранения патологических отложений фиброзного материала в паренхиматозных внутренних тканях, как например, в печени, легких, пищеводе, тонком кишечнике, почках, кровеносных сосудах, суставах, и при других системных формах кожного фиброза любого этиопатогенеза.

## ОПИСАНИЕ ПРЕДШЕСТВУЮЩЕГО УРОВНЯ ТЕХНИКИ

Случаи фиброза включают группу моноорганных или системных патологических процессов, характеризующихся патологическим отложением внеклеточного матрикса в паренхиме практически любого внутреннего органа, кровеносных сосудах или коже. Их рассматривают как следствие сочетанных событий аутоиммунного характера или интерстициальных ответов на длительные имитирующие и воспалительные процессы. Как правило, избыток коллагенового материала откладывается в паренхиме интерстициальными эффекторными клетками или разрастающимся материалом стромы, который вызывает облитерацию функциональной ткани. Эффекторные клетки, опосредующие эти события, обладают мезенхимальным происхождением и, как предполагают, вполне специфичны по отношению к поражаемой ткани. Как правило, миофибробласты принимают участие в вызывании патологических фиброзов. Механизмы, опосредующие развитие фиброза, являются сложными и остаются неполностью выясненными. Независимо от причины, как предполагают, трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), фактор роста соединительной ткани (CTGF) и тромбоцитарный фактор роста (PDGF) принимают участие в этих процессах независимо от органа-мишени. Длительные фиброзы, как правило, летальны при отсутствии до настоящего времени доступного лечения. Далее авторы настоящего изобретения описывают некоторые технические аспекты фиброзных процессов в различных органах (Ding J, Yu J, Wang C, Hu W, Li D, Luo Y, Luo H, Yu H. Ginkgo biloba extract alleviates liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in rats. *Liver International* 2005; 25: 1224-1232.) (Friedman SL. Reversal of hepatic fibrosis - Fact or fantasy? *Hepatology*. 2006 Jan 30;43(S1):S82-S88).

### **Фиброз печени**

Если печень повреждена, то воспалительный ответ и реструктурирование внеклеточного матрикса (EM) восстанавливают нормальную функцию и архитектуру этого органа. Однако, если процесс повреждения продолжается, то дисбаланс факторов, принимающих участие в восстановлении и устранении проблемы, изменяет регуляцию EM и способствует избыточному синтезу его компонентов. Печень является основным органом, принимающим участие в регуляции метаболизма, фильтрации крови и регуляции гормонов. Звездчатые клетки печени (HSC) расположены в пространстве между эндотелиальными клетками и гепатоцитами, которое называется пространством Диссе или перисинусоидальное пространство, окружая эндотелиальные клетки длинными цитоплазматическими отростками. HSC способны синтезировать и секретировать компоненты EM, и они представляют собой важный источник фиброзного материала. В них накапливаются сложные эфиры ретинола, синтезируются факторы роста и другие цитокины, с дополнительной ролью в регуляции воротного кровообращения. HSC могут переходить из покоящегося состояния в активное состояние посредством индукции паракринной секреции провоспалительных цитокинов, продукции активных форм кислорода или

посредством изменений структуры EM, нарушающей клеточный фенотип. В ходе активации HSC дифференцируются в вытянутые по форме миофибробласты, экспрессирующие гладкомышечный  $\alpha$ -актин и утрачивающие весь запасаемый ретинол. В этом состоянии HSC приобретают новые свойства, которые помогают им поддерживать и усиливать воспалительный ответ: способность к пролиферации, сократимость, продукция цитокинов и, главным образом, синтез и секреция компонентов EM. Среди основных факторов, способствующих продукции белков EM в активированных HSC, представлен TGF- $\beta$ , синтезируемый главным образом купферовскими клетками в активированной фазе; TGF- $\beta$  главным образом продуцируется HSC в фазе поддержания, поддерживая непрерывную активацию. Как правило, все фиброзные уплотнения печени несовместимы с жизнью

(Hepatic Failure. Last

Updated: September 3, 2004. Editor(s): David Eric Bernstein, MD, Chief, Section of Hepatology, North Shore University Hospital, Director, Associate Professor, Department of Internal Medicine, Division of Hepatology, New York University School of Medicine; Francisco Talavera, PharmD, PhD, Senior Pharmacy Editor, eMedicine; Oscar S Brann, MD, Associate Clinical Professor, UCSD School of Medicine; Program Director of Gastroenterology Fellowship, Department of Internal Medicine, Naval Medical Center San Diego; Alex J Mechaber, MD, FACP, Director of Clinical Skills Program, Assistant Professor, Department of Internal Medicine, Division of General Internal Medicine, University of Miami School of Medicine; и Julian Katz, MD, Professor, Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, MCP Hahnemann University) (Sarem M. Hepatic stellate cells: it's role in normal and pathological conditions. Gastroenterol Hepatol. 2006 Feb;29(2):93-101).

### **Фиброз легких**

Фиброз легких представляет собой сравнительно медленно прогрессирующее заболевание, также включающее несколько форм. Гистологически он характеризуется временной гетерогенностью повреждений, преобладанием фибробластов. Несмотря на то, что последовательность событий в патогенезе фиброза легких хорошо документирована, существует мало информации относительно точных механизмов, опосредующих основное поражение. Считается, что к этому имеют отношение иммунологические факторы, преимущественно аутоиммунные. Генетические факторы также принимают участие. Микроскопически, бессимптомное свойство включает гиперпластическое изменение в клетках альвеолярного эпителия (пневмоцитах II типа), сопровождающееся хорошо различимыми ядрышками и цитологическим атипизмом, как правило, имитируя вирусную инфекцию. Возможно обнаружение ультраструктурных внутриядерных тубулярных включений. Процесс отложения EM и, в частности, коллагена в паренхиме легкого бессимптомно нарушает архитектуру легкого, вызывая спадение бронхиол и альвеол, которые в конечном итоге становятся нефункциональными и нарушают легочную вентиляцию. TGF- $\alpha$  также принимает участие в качестве одного из основных цитокинов, которые регулируют этот процесс. Миофибробласты представляют собой EM-продуцирующие клетки (Medranda Gomez MA, Paricio Nunez P, Tovar Martinez A, Ferrer Marin F, Gonzalez Martinez P, Garcia Puche MJ. Pulmonary fibrosis. Rev Esp Enferm Dig. 2005 Nov;97(11):843-4).

### **Системный кожный фиброз или склеродермия**

Системный склероз (SS) представляет собой в высшей степени многокомпонентное заболевание. До настоящего времени не существует приемлемой теории, объясняющей его патогенез. Однако документированы существенные патологические изменения в фибробластах, эндотелиальных клетках и клетках иммунной системы, в частности, В- и Т-лимфоцитах. Функциональные изменения в этих клетках способствуют развитию типичной триады патологических изменений при SS: кожный и висцеральный прогрессирующий фиброз, облитерация просвета малых артерий и артериол, и иммунные нарушения. Изменения гуморального и клеточного иммунитета вызывают секрецию большого количества антител, некоторые из которых являются весьма специфичными для заболевания, инфильтрацию моноклеарных клеток в пораженные ткани и нарушение регуляции продукции цитокинов и факторов роста. До сих пор отсутствует ясность в том, какие из этих изменений являются основным событием, инициирующим заболевание, или связаны ли все они между собой при вызывании прогрессирующего фиброзного процесса при SS. Однако ключевой компонент патогенеза включает нарушение регуляции и постоянную активацию генов, кодирующих несколько типов коллагена и другие белки EM в фибробластах пациентов с SS. Это представляет собой основное отличие между нормальными фибробластами, способными к нормальному заживлению ран, и SS-фибробластами с неконтролируемой продукцией и отложением коллагена, что приводит к патологическому фиброзу в пораженных органах. Стоит повторить еще раз, что TGF- $\beta$  является одним из факторов роста, которые, как полагают, явным образом принимают участие в фиброзе тканей при SS. Один из наиболее важных эффектов включает синтез нескольких типов коллагена и других белков EM, таких как фибронектин (31). Фибробласты пациентов с SS экспрессируют на своих поверхностях значительные количества рецептора TCF- $\beta$ , возможно отвечающего за усиление сигнала, индуцируемого посредством TGF- $\beta$ , и усиление продукции коллагена (30). Это заболевание также необратимо приводит к летальному исходу (Steen V. Targeted therapy for systemic sclerosis. Autoimmun Rev. 2006 Feb;5(2): 122-4).

### **Диабетический нефросклероз или диабетическая нефропатия**

Практически у каждого пациента с диабетом развивается утолщение базальной мембраны клубочков и канальцев спустя 2-3 года после диагностирования заболевания. У некоторых из них также развивается расширение гломерулярного мезангия и интерстициальный фиброз, патологические маркеры прогрессирующей диабетической нефропатии. Эта нефропатия клинически прогрессирует также с развитием протеинурии, гипертензии и почечной недостаточности. Существует хорошая корреляция между расширением области мезангия, тяжестью интерстициального фиброза и атеросклерозом, что также приводит к уменьшению скорости клубочковой фильтрации. В конечном итоге расширение мезангия снижает растяжение клубочка в результате окклюзии клубочковых капилляров и уменьшения области эффективной фильтрации. Аналогичным образом, тубулоинтерстициальный фиброз приводит к изменению архитектуры и функции канальцев, вызывая почечную недостаточность. При этом заболевании выявлена роль TGF- $\beta$  в регуляции фиброзных процессов, происходящих в почках пациентов с диабетом. Это заболевание является прогрессирующим, бессимптомно развивающимся и приводит для пациента к летальному исходу вследствие почечной недостаточности

(Cohen, M. P., Ziyadeh, F. N., Hong, S. W., Shearman, C. W., Hud, E., Lautenslager, G. T., Iglesias-de la Cruz, M. C., & Chen, S. (2002). Inhibiting albumin glycation in vivo ameliorates glomerular overexpression of TGF-beta eta1. *Kidney Int*, 61: 2025-2032),  
 5 (Ziyadeh, F. N., Hoffman, B. B., Han, D. C., Iglesias-de la Cruz, M. C., Hong, S. W., Isono, M., Chen, S., McGowan, T. A., & Sharma, K. (2000). Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression and glomerular  
 10 mesangial matrix expression by treatment with monoclonal anti-TGF-beta antibody in db/db diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 8015-8020).

### **Фиброз полового члена или болезнь Пейрони**

По существу, заболевание включает патологический рубец эластической оболочки  
 15 (белочной оболочки) эректильной ткани полового члена, приводя к ретракции органа в спокойном состоянии и искривлению и ретракции в ходе эрекции. Хотя сложно зарегистрировать начало заболевания, большинство авторов согласно в том, что фиброзной дегенерации белочной оболочки предшествует воспалительный процесс, который вызывает васкулитный, иммунный или травматический процесс, или  
 20 коллагенопатию. Описывают первый период инвазии, когда фиброзная бляшка может бессимптомно прогрессировать, означая искривление или ретракцию полового члена с болью в ходе эрекции или проницаемостью. Преобладающие симптомы вызваны фиброзом. У некоторых пациентов может также наличествовать дополнительный  
 25 ассоциированный фиброз в хряще мочки уха. Хотя и не приводящее к летальному исходу это заболевание серьезно осложняет качество жизни пациентов. Стоит отметить еще раз, что TGF-β принимает участие в качестве провоцирующего или усиливающего фактора молекулярной основы заболевания (Jakut M. New discoveries in the basic science understanding of Peyronie's disease. *Curr Urol Rep*. 2004 Dec;5(6):478-84).

### **Микрососудистое заболевание мозга**

Васкулопатию выявляют в мозге пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, в качестве маркера патогенеза этой и других видов деменции. Послойное и  
 региональное распределение сосудистых повреждений коррелирует с появлением  
 35 нейрофибриллярных клубков и старческих бляшек. Более 100 лет назад ранее зарегистрировали физиологические аномалии в сосудах мозга пожилых людей, включая ригидность, искривление и извитость. Менее 20 назад эти данные были подтверждены с дополнительным описанием еще более деформированных сенильных  
 40 капилляров в гиппокампе с возрастными изменениями основных сосудов. Ультроструктурно можно различить: (а) мембранозные включения в базальной мембране; и (b) микрососудистые коллагеновые отложения (фиброз) или утолщение компонентов базальной мембраны. Капиллярные перициты заметно дегенерируют с возрастом. Отложение коллагеновых волокон во внутренней части базальной  
 45 мембраны наблюдали в мозге млекопитающих. Изгиб шириной 64 нм этих волокон позволил идентифицировать коллагеновый состав этого микрососудистого фиброза, расположенного между эндотелием и перицитами или на внутренней стороне базальной мембраны. Утолщение базальной мембраны и коллагеновые отложения  
 50 сходным образом усиливаются с возрастом у крыс и человека, и эти процессы фиброзной склеротической дегенерации микроциркуляторного русла мозга рассматривают в качестве анатомической основы процессов, как правило, ведущих к деменции. Протекание этих заболеваний клинически ухудшается при прогрессировании окклюзии сетей артериол, в конечном итоге делая невозможными

любые социальные взаимоотношения и когнитивную активность.

Роль сосудистого заболевания в патогенезе деменции в настоящее время переосмысливается, так как предполагают, что более 50% пациентов с деменцией обладают каким-либо признаком сосудистого заболевания мозга. Существуют другие нейромозговые, не относящиеся к деменции Альцгеймера процессы, опосредующие серьезное снижение памяти, обучаемости и общих навыков. Наиболее подходящим примером является церебральная аутосомно-доминантная артериопатия с подкорковыми инфарктами и лейкоэнцефалопатией (CADASIL). Это заболевание нуждается в прояснении на молекулярном и клеточном уровнях. Тем не менее, артериопатии, возникающие в результате прогрессирующего отложения осмофильного гранулярного материала, в последствии приводят к окклюзии просвета артерий, вызывая возникновение ишемических очагов в мозге с последующими случаями инфаркта. Утрата жизнеспособности нейронов в результате микроинфаркта нарушает основную нервную активность в мозге, приводя к состоянию старости и деменции (Nakanao I. The function and integrity of the neurovascular unit rests upon the integration of the vascular and inflammatory cell systems. *Curr Neurovasc Res.* 2005 Dec;2(5):409-23. Mott RT. *Neuropathology of Alzheimer's disease. Neuroimaging Clin N Am.* 2005 Nov; 15(4):755-65).

#### **Другие дегенеративные процессы. Отложение бета-амилоида**

Болезнь Альцгеймера является наиболее распространенной формой деменции и одной из основных причин смерти пожилых людей в возрасте старше 65 лет. В то время как причина заболевания неизвестна, в мозге пациентов с болезнью Альцгеймера показано связанное с заболеванием отложение нескольких типов белков внутри и снаружи нейронов. Бета-амилоид является одним из белков, образующих внеклеточные отложения в мозге и стволе мозга. Бляшки состоят из компактной сердцевины из бета-амилоидного белка, возникающего из белка-предшественника. Риск развития деменции сильно ассоциирован с полиморфизмами аполипопротеина E (Аро-Е). В мозге Аро-Е взаимодействует с бета-амилоидным белком, при этом Аро-Е4 связывается с усиливающимися отложениями бета-амилоида и увеличением количества нейрофибриллярных клубков.

Процессы внимания, обучаемости и памяти находятся среди способностей мозга, поражаемых при болезни Альцгеймера; это состояние рассматривают в качестве модельного среди заболеваний с деменцией, характеризующихся отложением бета-амилоида. До настоящего времени существует только одно лекарственное средство, одобренное FDA для лечения когнитивной дисфункции при болезни Альцгеймера. Бета-амилоид белок вызывает развитие некрогенных эффектов, опосредованных свободными радикалами в клетках мозга. Отложение бета-амилоида в паренхиме мозга является отличительным маркером патогенеза при болезни Альцгеймера, хотя и наблюдается в меньшем количестве при нормальном физиологическом старении.

Снижение синтеза бета-амилоидного нейротоксичного варианта белка может ослабить процессы, способствующие повреждению нейронов при болезни Альцгеймера. Сходным образом, удаление его из мозга и дальнейшая экскреция могут внести вклад в восстановление основных функций нервной системы у пациентов. Болезнь Альцгеймера в значительной степени снижает качество жизни пациентов и до сих пор она неизлечима (Gurol ME. *Plasma beta-amyloid and white matter lesions in AD, MCI, and cerebral amyloid angiopathy. Neurology.* 2006 Jan 10;66(1):23-9.; Han HS. The function and integrity of the neurovascular unit rests upon the integration of the vascular and inflammatory cell systems. *Curr Neurovasc Res.* 2005 Dec;2(5):409-23; Anderson E. The

Oorganic Brain Syndrome (OBS) scale: a systematic review. Int J Geriatr Psychiatry. 2006 Jan 27).

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к применению стимулирующих секрецию пептидов в фармацевтической композиции, содержащей GRHP-6, GRHP-2, гексарелин и/или грелин, где указанная фармацевтическая композиция предотвращает, контролирует и устраняет патологические внутри- и внеклеточные отложения гиалинового материала, амилоида, гранулярных форм эозинофильного и осмофильного материала во внутренних органах, наружных органах и органах сосудистой сети, таких как печень, легкие, пищевод, кишечник, почки, кровеносные сосуды, суставы и остальная часть системных кожных вариантов фиброза любого этиопатогенеза, где указанную композицию применяют в организме реципиента. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой жидкую, полутвердую или твердую композицию, пригодную для введения внутривенным, внутримышечным, внутрибрюшинным, подкожным, интратекальным, ректальным и местным способами, местной инфильтрацией в кожу или слизистую оболочку, эпителии или органы, более конкретно внутрь очага и/или вокруг очага. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит пептиды GHRP-6, GHRP-2, гексарелин и/или грелин в концентрациях 5 микрограммов-1 миллиграмм, более конкретно в концентрации 30-500 микрограммов на дозу, и фармакологически приемлемый носитель.

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фиг. 1. Процентная доля животных, пораженных фиброзом почек, в группе в конце лечения посредством GHRP-6. Следует обратить внимание на существующие различия между группой с плацебо, которая получала солевой раствор, и группами, получавшими GHRP-6. Наибольшее различие наблюдали при сравнении группы с плацебо с группой, получавшей дозировку 400 мкг/кг, что позволяет предположить дозозависимый эффект. Гистологическая оценка фибропролиферативной реакции почечного интерстиция включает фиброзную инкапсуляцию канальцев и также фиброз клубочков. Таким образом, установлена градация общего почечного фиброза, применяемая для определения процентной доли животных, пораженных или непораженных в конце лечения. (а) - Статистические различия с  $p < 0,001$  между группой, получавшей дозировку 400 мкг/кг GHRP-6, и группой с плацебо.

### ПРИМЕРЫ

#### Пример 1. Обратное развитие фиброза печени у крыс

Настоящий эксперимент осуществляли для оценки эффекта фармацевтической композиции на основе GHRP-6 на обратное развитие фиброза печени у крыс. Фиброз печени индуцировали у самцов крыс Wistar со средней массой тела 250 г наложением лигатуры на наружный желчный проток. Для этой цели крыс анестезировали сочетанием кетамина/ксилазина и подвергали лапаротомии для получения доступа к общему желчному протоку. На проток накладывали двойную лигатуру с помощью хромированного кетгута 4-0. После хирургической операции животных случайным образом распределяли по 3 экспериментальным группам из 20 крыс в каждой: (1) контрольная группа с плацебо, получавшая физиологический солевой раствор, (2) группа, получавшая GHRP-6 в дозировке 100 мкг/кг, и (3) группа, получавшая GHRP-6 в дозировке 400 мкг/кг. Обработки проводили ежедневно в течение трех недель после индуцирования фиброза паренхимы печени. Все обработки начинали спустя три недели после появления фиброза. Отслеживание повреждения печени проводили с

помощью еженедельного ультразвукового обследования проекционной области этого органа, динамики уровней трансаминаз GOT и GPT в сыворотке, уровней гамма-глутамилтрансферазы (GGT) и объема асцита. Обработки посредством GHRP-6 или плацебо осуществляли внутривенным способом один раз в сутки. После

5 окончания обработок животных забивали и осуществляли забор сыворотки крови и печени. Фрагменты печени фиксировали в нейтральном формалине и проводили окрашивание гематоксилином/эозином или трихромное окрашивание по Массону для

10 оценки общего повреждения и тяжести фиброзных уплотнений. Другие фрагменты тканей печени хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  до обработки для определения содержания гидроксипролина путем кислотного гидролиза в 1 Н HCl и также внутрипеченочных

уровней маркеров окислительно-восстановительного метаболизма. Биохимические определения выполняли путем подсчета содержания общего белка способом по

15 Бредфорд.

Таблица 1

Шкала градации процесса: (0) - \*отсутствие, (1) - умеренное, (2) - ограниченное, (3) - тяжелое, (4) - очень тяжелое.

Экспериментальная группа	Степень 0	Степень 1	Степень 2	Степень 3	Степень 4
Плацебо (N=14)	0	0	2	5*	7 (50%)
Дозировка I (N=16)	5	9	2	0	0
Дозировка II (N=20)	8	11	1	0	0

\* $p < 0,001$ . Критерий хи-квадрат.

Таблица 2

Оценка уровней гидроксипролина в печени в конце трех недель лечения

Экспериментальная группа	Содержание ОН-Р (мкг/г общего белка)
Плацебо (N=14)	133,25±21,69**
Дозировка (N=16)	56,71±8,11
Дозировка (N=20)	16,15±1,025

\*\* $p=0,00021$ . Плацебо по сравнению с обработанными. \* $p=0,001$  Дозировка I по сравнению с дозировкой II. Двусторонний t-критерий Стьюдента.

Таблица 3

Уровни GOT, GPT и GGT в сыворотке во всех группах в конце трех недель лечения

Экспериментальная группа	GOT (МЕ/л)	GPT (МЕ/л)	GGT (МЕ/л)
Интактные животные	32,56±9,27	20,93±7,74	23,62±5,21
Плацебо (N=14)	115,84±27,80**	155,30±11,63**	143,18±25,36**
Дозировка I (N=16)	61,58±16,10*	81,71±30,90*	71,53±22,14*
Дозировка II (N=20)	30,41±6,11	60,64±19,87	25,56±8,63

\*\*  $p=0,0003$ . Плацебо по сравнению с обработанными исходя из дозировки II и интактными животными. \* $p=0,0002$  Дозировка I по сравнению с дозировкой II и интактными животными. Никаких различий не обнаружено между интактными животными и животными с дозировкой II. Двусторонний t-критерий Стьюдента.

Таблица 4

Уровни маркеров оксидативного стресса в образцах печени в конце третьей недели лечения

Экспериментальные группы	SODt	Каталаза	НПТ	MDA
Интактная группа	28261,08± 1260,94	16,40±3,95	27,25±2,47	0,06±0,01
Группа с солевым раствором - плацебо	573,83± 645,93**	580,58± 57,39**	108,66± 15,82**	0,25±0,04**
Группа с дозировкой I	11058,07± 744,61*	68,50± 12,73*	43,06± 1,83*	0,14±0,02*
Группа с дозировкой II	21029,87± 498,28	31,50±4,3	21,16±1,71	0,08±0,01

\*\*p=0,0001. Плацебо по сравнению с обработанными исходя из дозировки II и интактными. \*p=0,0003 Дозировка I по сравнению с дозировкой II и интактными. Никаких различий не обнаружено между интактными и дозировкой II. Двусторонний t-критерий Стьюдента.

Обработка GHRP-6 ясно показывает способность пептида устранять и контролировать отложение коллагенового и внеклеточного материала в паренхиме печени, которое вызывается наложением лигатуры на общий печеночный проток. Пригодность лечения показывает согласованность морфологических и биохимических данных, что подтверждает коррекцию далеко зашедшего перидуктального и перипортального фиброзного состояния. Важно отметить, что у животных в группе с плацебо не отмечали спонтанной ремиссии.

### Пример 2. Обратное развитие фиброза печени у крыс

Этот эксперимент проводили для оценки эффекта фармацевтической композиции, содержащей GHRP-6, на обратное развитие фиброза печени у крыс, где указанный фиброз печени индуцировали тетрахлоридом углерода (CCl<sub>4</sub>). Он представляет собой гепатотоксическое вещество, которое вызывает хронический гепатит и фиброз после длительного введения. Фиброз печени индуцировали у самцов крыс Wistar массы тела 250 г внутрибрюшинным введением CCl<sub>4</sub> в оливковом масле 50%/50% (об./об.) два раза в неделю в течение четырех недель. После этого времени 25% крыс забивали и подвергали исследованиям на биохимию крови и патологическую анатомию. Процесс фиброза печени обнаружили у всех исследованных животных. Оставшихся животных случайным образом распределили по трем экспериментальным группам из 15 крыс в каждой: (1) контрольная группа с плацебо, получавшая физиологический солевой раствор, (2) группа, получавшая GHRP-6 в дозировке 100 мкг/кг, и (3) группа, получавшая GHRP-6 в дозировке 400 мкг/кг. Обработки осуществляли один раз в сутки в течение четырех недель после детектирования фиброзного процесса в паренхиме печени. Обработки начинали непосредственно после развития фиброза и введения суспензии CCl<sub>4</sub>. После окончания обработок животных забивали и осуществляли забор сыворотки крови и печени. Фрагменты печени фиксировали в нейтральном формалине и проводили окрашивание гематоксилином/эозином или трихромное окрашивание по Массону для оценки общего повреждения и тяжести фиброзных уплотнений. Другие фрагменты тканей печени хранили при -70°C до обработки для определения содержания гидроксипролина путем кислотного гидролиза в 1 Н HCl и также внутрипеченочных уровней маркеров окислительно-восстановительного метаболизма. Биохимические определения выполняли путем подсчета содержания общего белка способом по Бредфорд. Ответ на лечение фармацевтической композицией характеризовали определением уровней трансаминаз GOT и GPT в сыворотке, гистологическими критериями по количественной шкале и некоторыми маркерами, характеризующими уровни перекисного окисления липидов.

Таблица 5

Шкала градации процесса: (0) - отсутствие, (1) - умеренное, вплоть до 25% препарата, (2) - ограниченное, вплоть до 50% препарата, (3) - тяжелое, вплоть до 75% препарата, (4) - очень тяжелое, более 75% препарата. Гистологическая оценка мостовидных структур фибропролиферативной реакции, включая сопутствующий некроз в зоне III. Животные на группу согласно степени поражения в конце лечения.

Экспериментальная группа	Степень 0	Степень 1	Степень 2	Степень 3	Степень 4
Плацебо	0	0	0	5*	10**
Дозировка I	0	9	6*	0	0
Дозировка II	8*	7	0	0	0

\*p<0,001. Критерий хи-квадрат. Степень 0. Группа II по сравнению с плацебо и дозировкой I. Степень 1. Дозировка I и II по сравнению с плацебо. Плацебо, степени 3 и 4 по сравнению с обработанными животными.

5

Таблица 6 Оценка уровней гидроксипролина в печени в конце лечения	
Экспериментальная группа (N=15)	Содержание ОН-Р (мкг/г общего белка)
Плацебо	86,19±11,43**
Дозировка I	40,21±3,54*
Дозировка II	10,22±4,33

\*\*p=0,00021. Плацебо по сравнению с обработанными.  
\*p=0,001 Дозировка I по сравнению с дозировкой II. Двусторонний t-критерий Стьюдента.

10

Таблица 7 Уровни GOT и GPT в сыворотке во всех группах в конце лечения		
Экспериментальная группа	GOT (МЕ/л)	GPT (МЕ/л)
Интактные животные	31,56±6,55	18,77±6,53
15 Плацебо	111,97±36,50**	274,14±21,75**
Дозировка I	56,31±12,19*	77,15±22,66*
Дозировка II	28,18±4,71	26,94±12,42

\*\*p=0,0005 Плацебо по сравнению с обработанными исходя из дозировки II и интактными животными. \*p=0,001 Дозировка I по сравнению с дозировкой II и интактными животными. Никаких различий не обнаружено между интактными животными и животными с дозировкой II. Двусторонний t-критерий Стьюдента.

20

Таблица 8 Уровни маркеров оксидативного стресса в образцах печени в конце третьей недели лечения				
Экспериментальные группы	SODt	Каталаза	НРТ	MDA
25 Интактная группа	28261,08± 1260,94	14,84±1,24	18,72±3,22	0,09±0,02
Группа с плацебо-солевым раствором	289,2± 116,1**	560,59± 44,28**	257,84± 86,14**	0,56±1,04**
Группа с дозировкой I	17632,08± 321,55**	60,43± 11,81*	55,11±2,77	0,16±1,16*
Группа с дозировкой II	20187,87± 245,13	22,67±3,56	26,44±2,43	0,09±0,01

30 \*\*p=0,0002 Плацебо по сравнению с обработанными: дозировка I и II и интактные животные. \*p=0,0005 Дозировка I по сравнению с дозировкой II, плацебо и интактными животными. Никаких различий не обнаружено между интактными животными и животными с дозировкой II. Двусторонний t-критерий Стьюдента.

Лечение GHRP-6 говорит в целом о способности этого пептида устранять и контролировать отложение материала коллагенового и внеклеточного матрикса в паренхиме печени вследствие повторного введения CCl<sub>4</sub>. Лечение также предотвращает индивидуальную, очаговую и периферическую гибель гепатоцитов. Пригодность лечения показывают согласующиеся морфологические, ферментативные и биохимические данные, подтверждающие обратное развитие установленного и вызывающего нарушение функций тяжелого диффузного фиброза печени с образованием сливающихся мостовидных структур до практически недетектируемых уровней без ремиссии. Стоит отметить еще раз, что у животных группы с плацебо не наблюдали спонтанных ремиссий.

45 **Пример 3.** Обратное развитие фиброза почек у крыс с нефросклерозом. Третий эксперимент.

Этот эксперимент проводили для оценки эффекта фармацевтической композиции, содержащей GHRP-6, на обратное развитие фиброза почек у крыс. В этом случае процесс индуцировали длительным введением противоопухолевого средства доксорубина (DX) в дозировке 2,5 мг/кг два раза в неделю в течение 8 недель. Возникновение фиброзного отложения в перипортальном, перибронхиальном и во всем интерстиции почек с образованием кистозно-узелковой структуры показано гистопатологическими исследованиями этих органов в 25% популяции крыс,

подвергшихся интоксикации доксорубицином. После этого момента введение DX прекращали и начинали обработку фармацевтической композицией, содержащей GHRP-6. Обработку осуществляли один раз в сутки из расчета 100 и 400 мкг/кг в объеме 1 мл внутривенным способом в течение 4 недель. Оставшихся животных случайным образом распределяли по трем экспериментальным группам из 20 крыс в каждой: (1) контрольная группа с плацебо, получавшая физиологический солевой раствор, (2) группа, получавшая GHRP-6 в дозировке 100 мкг/кг, и (3) группа, получавшая GHRP-6 в дозировке 400 мкг/кг. После окончания обработок животных забивали передозировкой анестезии и осуществляли забор печени, почек, легких и сывороток крови. Фрагменты тканей фиксировали в нейтральном формалине и проводили окрашивание гематоксилином/эозином или трихромное окрашивание по Массону для оценки общего повреждения и тяжести фиброзных уплотнений. Другие фрагменты хранили при -70°C до обработки для определения содержания гидроксипролина путем кислотного гидролиза в 1 Н HCl и также уровней креатинина и маркеров оксидативного стресса. Биохимические определения выполняли путем подсчета содержания общего белка способом по Бредфорд.

Таблица 9

Количество животных в группе для каждого уровня тяжести фиброзного поражения. Шкала градации фиброзного процесса в почках:

Степень (0) - отсутствие;

степень (1) - умеренная, поражение интерстиция без деформации или инкапсуляции канальцев или клубочков;

степень (2) - интенсивная, поражение всего интерстиция с деформацией канальцев, облитерацией их просвета и наружной инкапсуляцией клубочков;

степень (3) - очень интенсивная, инкапсуляция и спадение канальцев, и спадение клубочков. Также включает мезангиальные отложения.

Экспериментальная группа (N=20)	Степень 0	Степень 1	Степень 2	Степень 3
Плацебо	0	1	4	15*
Дозировка I	6	9	5	0
Дозировка II	5	15*	0	0

\*p<0,001. Критерий хи-квадрат

Таблица 10

Оценка уровней гидроксипролина в почках в конце лечения

Экспериментальная группа (20 животных в группе)	Содержание ОН-Р (мкг/г общего белка)
Плацебо	65,21±22,16**
Дозировка I	46,15±2,73*
Дозировка II	8,66±1,02

\*\*p=0,0001 Плацебо по сравнению с обработанными.

\*p=0,05 Дозировка I по сравнению с дозировкой II.

Двусторонний t-критерий Стьюдента.

Таблица 11

Уровни GOT и GPT в сыворотке во всех группах в конце лечения. Целостность паренхимы печени

Экспериментальная группа	GOT (МЕ/л)	GPT (МЕ/л)
Плацебо	124,12±28,3**	188,77±16,98**
Дозировка I	64,82±23,71*	81,0±10,25*
Дозировка II	26,22±4,1	28,25±5,66

\*\*p=0,0005 Плацебо по сравнению с обработанными.

\*p=0,042 Дозировка I по сравнению с дозировкой II.

Двусторонний t-критерий Стьюдента

Таблица 12

Уровни маркеров оксидативного стресса в образцах ткани почек в конце четвертой недели лечения

Экспериментальные группы	SODt	Каталаза	НРТ	MDA
Группа с плацебо-солевым раствором	199,7± 6,81**	356,2±18,15**	287,11± 20,02**	0,981±1,1**
Группа с дозировкой I	665,08± 28,42*	126,02±12,23*	73,2±6,92	0,56±2,23*
Группа с дозировкой II	1287,64± 112,63	45,38±8,27	16,14±3,67	0,087±0,02

5 \*\*p=0,0002 Плацебо по сравнению с обработанными: дозировки I и II и интактные животные.  
\*p=0,0005 Дозировка I по сравнению с дозировкой II, плацебо и интактными животными. Никаких различий не обнаружено между интактными животными и животными с дозировкой II. Двусторонний t-критерий Стьюдента.

#### Пример 4. Контроль фиброза легких

10 Этот эксперимент проводили для оценки эффекта фармацевтической композиции, содержащей GHRP-6, на обратное развитие фиброза почек у крыс. В этом случае процесс индуцировали длительным введением противоопухолевого средства блеомицина (Ble) в дозировке 2,5 Ед/кг два раза в неделю в течение 4 недель. При гистопатологическом анализе фиброз выявляли в легких 25% животных, 15 подвергнутых интоксикации Ble. После этого момента введение Ble приостанавливали и начинали обработку фармацевтической композицией, содержащей GHRP-6. Обработку осуществляли один раз в сутки из расчета 100 и 400 мкг/кг в объеме 1 мл внутрибрюшинным способом в течение 4 недель. Животных случайным образом 20 распределяли по трем экспериментальным группам из 10 крыс в каждой: (1) контрольная группа с плацебо, получавшая физиологический солевой раствор, (2) группа, получавшая GHRP-6 в дозировке 100 мкг/кг, и (3) группа, получавшая GHRP-6 в дозировке 400 мкг/кг. После окончания обработок животных забивали передозировкой анестезии и осуществляли забор легких и сыворотки крови. 25 Фрагменты тканей фиксировали в нейтральном формалине и проводили окрашивание гематоксилином/эозином или трихромное окрашивание по Массону для оценки общего повреждения и тяжести фиброзных уплотнений. Другие фрагменты тканей легких хранили при -70°C до обработки для определения содержания 30 гидроксипролина путем кислотного гидролиза в 1 Н HCl и также внутривенных уровней маркеров окислительно-восстановительного метаболизма. Биохимические определения выполняли путем подсчета содержания общего белка способом по Бредфорд. Гистологическая оценка фибропролиферативной реакции в легких включает процесс периваскулярного, перибронхиального и септального фиброза. 35 Общую степень фиброза легких устанавливали согласно распространенности и интенсивности процесса в этих трех сегментах для определения процентной доли пораженных или непораженных животных в конце обработки посредством GHRP-6. Количества животных в каждой группе с фиброзом легких согласно тяжести фиброза 40 составляют:

Степень 0 - отсутствие признаков фиброза или только наличие очагов материала из тонких и диффузных волокон или ареолярного материала, без легочной недостаточности.

45 Степень 1 - преимущественно сосудистый фиброз в более 75% артериол и капилляров.

Степень 2 - преимущественно сосудистый фиброз в более 75% артериол и капилляров с дополнительным перибронхиальным поражением.

50 Степень 3 - преимущественно сосудистый фиброз в более 75% артериол и капилляров с дополнительным перибронхиальным поражением. Фиброзный материал также детектируют в межальвеолярной перегородке.

Таблица 13  
Животные, классифицируемые согласно тяжести фиброза легких в каждой группе

Экспериментальная группа (N=15)	Степень 0	Степень 1	Степень 2	Степень 3
Плацебо	0	0	5	10*
Дозировка I	3	10	2	0
Дозировка II	8	7	0	0

\*p<0,05 Точный критерий Фишера

Как можно видеть, в группе с плацебо отсутствовали животные, соответствующие степени 0 или степени 1 по шкале. Их большую часть классифицировали по тяжести как степень 3. В то же время дозировка II обладала мощным защитным эффектом, при которой более 50% животных классифицировали как степень 0.

Таблица 14 Оценка уровней гидроксипролина в легких в конце лечения солевым раствором или GHRP-6	
Экспериментальная группа (15 животных в группе)	Содержание ОН-Р (мкг/г общего белка)
Плацебо	178,53±42,77**
Дозировка I	91,24±16,84*
Дозировка II	12,75±3,61

Эффект устранения или обратного развития фиброза легких, вызванного Ble, также подтвержден содержанием гидроксипролина в высушенных образцах легочных тканей, что совпадает с описанными выше гистопатологическими результатами.

До сих пор представлены данные, подтверждающие мощный противифиброзный эффект фармацевтической композиции, содержащей GHRP-6, в четырех независимых экспериментах, включающих, соответственно, два исследования фиброза печени, одно исследование фиброза почки и одно исследование легкого. Их результаты обладают повторяемостью и воспроизводимостью, что указывает на эффективность лечения для контролирования этих процессов в более чем одном внутреннем органе, независимо от их этиопатогенетической причины.

Пример 5. Эффект фармацевтической композиции, содержащей GHRP-6, в контролировании и устранении отложения бета-амилоидного белка в мозге.

Данное исследование проводили для оценки влияния длительного введения (8 недель) GHRP-6 на биохимические и морфологические маркеры мозга трансгенных мышей, экспрессирующих белок-предшественник бета-амилоида; эти маркеры также указывают на прогрессирование повреждения центральной нервной системы. Для настоящего исследования приобретали самцов трансгенных мышей APP массой тела 20-25 г, экспрессирующих белок-предшественник бета-амилоида. Животных (N=30) случайным образом распределяли по:

Группа с плацебо - 0,9% физиологический солевой раствор.

Группа с дозировкой I - GHRP-6 из расчета 50 мкг/кг массы тела в солевом растворе.

Группа с дозировкой II - GRHP-6 из расчета 100 мкг/кг массы тела в солевом растворе.

Обработки осуществляли внутрибрюшинным способом в 1 мл, пять суток в неделю в течение 8 недель, при этом животные получали 40 введений GHRP-6. Авторам настоящего изобретения известно из ранее проведенных пробных предварительных исследований, что этот период времени достаточен для улучшения когнитивных и двигательных способностей у животных после стресса.

После 8 недель обработки мышей забивали передозировкой анестезии и осуществляли перфузию in situ солевым раствором. Головной мозг извлекали, один головной мозг замораживали в сухом льду и другой фиксировали в 4% нейтральном параформальдегиде. На основе образцов получали криосрезы 10 мкм, и срезы

окрашивали гематоксилином/эозином, конго красным или инкубировали с антителом, специфичным по отношению к бета-амилоидному белку. Морфометрические процедуры осуществляли получением микроскопических изображений с помощью камеры, соединенной с микроскопом, и изображения анализировали посредством программного обеспечения DIGIPAT.

#### Исследуемые маркеры

Количество фибриллярных отложений бета-амилоидного белка, положительно окрашиваемого конго красным.

Количество очагов, иммунореактивных по отношению к антителу, которое распознает бета-амилоидный белок.

Размер бета-амилоидных бляшек в мозге, детектируемых при 200X и 400X увеличении (мкм<sup>2</sup>).

Концентрация в мозге миоинозитола, как индикатора старения и нарушения метаболизма мозга (мкмоль/г ткани).

Экспериментальная группа	Количество отложений, положительных в отношении конго красного	Количество отложений, положительных в отношении бета-амилоида	Размер амилоидных бляшек	Концентрация миоинозитола в мозге
Плацебо	35,64± 11,33**	31,27±8,9**	48,5±2,03**	61,28±16,33**
Дозировка I. GHRP6	21,78±6,57*	15,11±3,27	15,51±6,44	49,35±10*
Дозировка II. GHRP6	14,52±4,18	13,58±4,61	10,88±4,1	27,45±8,61

\*\*p=0,0001. \*p=0,0023. U-критерий Манна-Уитни.

Все результаты, соответствующие исследуемым параметрам, представлены в таблице 15, характеризующей эффект длительной обработки фармацевтической композицией, содержащей GHRP-6. Следует обратить внимание, что результаты относятся к подсчету на цифровых изображениях одного головного мозга. Для преодоления этого ограничения подсчеты осуществляли вслепую три независимых индивидуума, и представленные результаты соответствуют исследованиям 5 препаратов. На таблице 15 показан эффект фармацевтической композиции, содержащей GHRP-6, в контроле накопления бета-амилоида и биохимии мозга. Как можно видеть, после 8 недель лечения фармацевтической композицией, содержащей GHRP-6, правдоподобен положительный эффект в контроле накопления бета-амилоида в его различных формах и также в коррекции метаболизма этого органа. Заметный эффект, характеризуемый снижением накопления миоинозитола, свидетельствует о коррекции биохимических путей ассимиляции большого количества энергии и питания нейронов. Это может обладать благоприятным клиническим эффектом на контроле процесса старения в мозге.

В следующей таблице 16 представлен благоприятный эффект фармацевтической композиции, содержащей GHRP-6, на контроле перекисного окисления липидов в мозге при болезни Альцгеймера трансгенных мышей. Следует еще раз отметить, что эти свидетельства позволяют предположить благоприятный эффект этой фармацевтической композиции в контроле одного из процессов, отвечающих за деградацию нервной ткани при заболевании и старении.

Экспериментальные группы	SODt	Каталаза	НРТ	MDA
--------------------------	------	----------	-----	-----

Группа с плацебо-солевым раствором	475,9± 60,32**	118,6± 26,33**	105,6± 22,1**	1,232± 1,14**
Группа с дозировкой I	611,17± 44,79*	81,6±15,25	54,3±11,87*	0,77±1,56*
Группа с дозировкой II	863,22± 50,3	60,18±13,67	21,25±5,44	0,4±0,02
**p=0,00014 Плацебо по сравнению с обработанными: дозировка I и II. *p=0,025 Дозировка I по сравнению с дозировкой II. U-критерий Манна-Уитни				

**Пример 6.** Эффект фармацевтической композиции на основе GHRP-6 и других пептидов в контроле деменции сосудистого происхождения. Устранение осмофильного материала в коре мозга. Предотвращение и контроль процесса старения мозга.

Этот эксперимент проводили для оценки эффективности фармацевтических композиций, содержащих без различия один из пептидов GHRP-6, GHRP-2, гексарелин или грелин, на процесс нейрофункциональной инволюции в центральной нервной системе у трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих одну мутантную форму гена NOTCH 3 в клетках гладкой мускулатуры кровеносных сосудов. У этих животных в течение месяцев развивается артериопатия, сходная с артериопатией при заболевании CASADIL, связанном с описательной памятью, и являющемся одной из основных причин сосудистой деменции. У этих животных сосудистые повреждения также включают ретинально-церебральную, церебральную и кохлеарную васкулопатии. Гистопатологически значимыми являются бета-амилоидный материал, присутствующий в мозге и кровеносных сосудах, отложение осмофильного гранулярного материала в мозге и стенках менингеальных артерий и их суженном просвете. В мозге и его основных нервных стволах появляются белесоватые зоны, зоны очагов микроинфаркта и геморрагии.

Использовали мышей в возрасте от восемнадцати до двадцати месяцев, когда проявлялись симптомы заболевания. Животных случайным образом распределяли по следующим группам с экспериментальной обработкой:

A - Группа с плацебо, получавшая физиологический солевой раствор.

B - Группа, получавшая GHRP-6 в дозировке 100 мкг/кг.

C - Группа, получавшая GHRP-2 в дозировке 100 мкг/кг.

D - Группа, получавшая грелин в дозировке 100 мкг/кг.

E - Группа, получавшая гексарелин в дозировке 100 мкг/кг.

Обработки осуществляли два раза в неделю в течение 16 недель внутрибрюшинным способом. После окончания обработок проводили исследования путем аутопсии безотносительно к клиническому улучшению, выявленному у значительного числа обработанных животных. Образцы тканей мозга, включающие ткани оболочек мозга, забирали для биохимических и гистопатологических исследований. Животные получали передозировку анестезии и их подвергали внутрисердечной перфузии холодным физиологическим солевым раствором для удаления крови, присутствующей в головном мозге. Головной мозг извлекали, и один головной мозг замораживали в сухом льду, и другой фиксировали в 4% нейтральном параформальдегиде. На основе образцов получали криосрезы 10 мкм, и срезы окрашивали гематоксилином/эозином, конго красным или инкубировали с антителом, специфичным по отношению к бета-амилоидному белку. Морфометрические процедуры осуществляли получением микроскопических изображений с помощью камеры, соединенной с микроскопом, и изображения анализировали посредством программного обеспечения DIGIPAT.

#### **Исследуемые маркеры**

Количество фибриллярных отложений бета-амилоида в кровеносных сосудах.

Количество подкорковых инфарктов.

Количество подкорковых геморагий.  
 Концентрация в мозге миоинозитола как индикатора старения и нарушения  
 метаболизма мозга (мкмоль/г ткани).  
 Маркеры оксидативного стресса в мозге.

5

10

15

Экспериментальные группы	Количество кровеносных сосудов, положительных в отношении конго красного	Количество кровеносных сосудов, положительных в отношении окрашивания по Нисслю	Количество подкорковых инфарктов	Количество геморагических очагов
Плацебо	35,64±11,33**	31,27±8,9**	48,5±2,03**	41,28± 16,33**
GHRP-6	16,31±5,33	14,22±8,15	26,79±4,19	19,05±5,14
GHRP-2	18,26±4,57	13,8±6,76	30,13±5,72	11,79±4,25
Грелин	17,67±2,26	11,27±4,61	26,9±4,27	13,06±2,77
Гексарелин	15,24±1,24	11,36±6,4	27,11±3,55	14,61±3,31

\*\*p<0,0002 между плацебо и остальными группами, обработанными любой из фармацевтических композиций, содержащих любое из исследуемых веществ

20

25

Как можно видеть, обработка каждым из стимулирующих секретию пептидов, значительно снижает количество артерий, артериол и капилляров, положительных в отношении фибриллярного амилоида (конго красный) и гранулярных отложений осмофильного материала (окрашивание по Нисслю). Следовательно, количество наличествующих подкорковых инфарктов и геморагических очагов, связанных с лейкоэнцефалопатией, также значительно снижено в каждой из групп, обработанных фармацевтическими композициями.

30

35

Экспериментальные группы	SODt	Каталаза	НПТ	MDA	Миоинозитол мозга
Группа с солевым раствором	360,9± 42,48**	274,6± 30,14**	265,4± 18,7**	0,984± 0,04**	44,2± 10,08**
GHRP-6	12327,31± 55,1	51,5±16,01	101,7± 22,09	0,23± 0,05	12,36±5,64
GHRP-2	11065,49± 46,29	48,23±14,25	117±13,55	0,302± 0,01	14,65±4,38
Грелин	12290,9± 60,32	44,67±11,58	142,16± 10,01	0,261± 0,03	14,04±3,85
Гексарелин	10814,68± 33,08	51,19±7,84	54,3± 11,87	0,284± 0,01	11,88±2,71

\*\*Представляет различия p<0,01 между животными группы с плацебо, получавшими физиологический солевой раствор, и остальными группами, тестируемыми индивидуальными фармацевтическими композициями, содержащими соответствующие пептиды.

40

45

50

Эффект пептидов также примечательным образом зарегистрирован при исследовании процесса перекисного окисления липидов в мозге трансгенных мышей как модели заболевания CADASIL человека. Как показано посредством уменьшения сосудистого повреждения и количества инфарктов, исследуемые в данной работе стимулирующие секрецию пептиды обладают способностью снижать или ослаблять нейротоксичность, связанную с повышенной продукцией активных форм кислорода при заболевании человека; эту повышенную продукцию также выявили у животных, получавших солевой раствор. Этот эффект распространяет идею общей нейропротекции с использованием этих веществ на контексты, в которых старение мозга опосредовано сосудистым повреждением и избыточным перекисным окислением липидов.

**Пример 7.** Эффект пептидов GHRP-6, GHRP-2, гексарелина и/или грелина на устранение патологических отложений физиологического материала в коже.

Для исследования эффектов пептидов GHRP-6, GHRP-2, гексарелина и/или грелина на устранение патологических отложений физиологического материала в коже,

келоидные фрагменты человека ксенотрансплантировали в дорсальную область бестимусных мышеч. После 72 час развития, чтобы способствовать привитию и жизнеспособности ксенотрансплантатов, животных (N=6) случайным образом распределяли по следующим экспериментальным группам:

- А - Контрольная группа с солевым раствором (носитель для активных веществ).
- В - Группа, получавшая GHRP-6.
- С - Группа, получавшая GHRP-2.
- Д - Группа, получавшая грелин.
- Е - Группа, получавшая гексарелин.

Обработки осуществляли один раз каждые 24 час в течение 7 суток. Для местной биодоступности активных веществ, вещества наносили инфильтрацией на границы имплантатов в дозировках от 5 микрограммов до 1 миллиграмма. После периода обработки животных забивали, и имплантаты извлекали для оценки фармакологического ответа на каждое вещество. Образцы взвешивали и фрагментировали для гистологических исследований и биохимических определений коллагена. Фрагменты для гистологических исследований фиксировали в 10% нейтральном формалине, и фрагменты для биохимических анализов хранили при -70°C.

Исследуемые параметры представляли собой:

- a - Масса во влажном состоянии выделенного имплантата.
  - b - Содержание гидроксипролина в ткани.
  - c - Количество полей зрения микроскопа с положительным в отношении ткани окрашиванием пикросириусом красным и трихромным окрашиванием по Массону. Изображения получали при 4X и 10X увеличениях, данные усредняли для каждого увеличения.
  - d - Количество тучных клеток по количеству полей зрения микроскопа, положительных в отношении окрашивания анилиновым синим, при 20X увеличениях.
- Как представлено в таблице 19, все исследуемые пептиды обладали значительным противофиброзным эффектом при сравнении с животными, получавшими носитель в качестве контроля.

Группа с обработкой	Масса во влажном состоянии (граммы)	Содержание гидроксипролина (мкг/г)	Количество полей, положительных в отношении коллагенспецифичного окрашивания	Количество полей зрения микроскопа с тучными клетками (20X увел.)
Контроль с солевым раствором	13,55±2,31	258,61±12,53	37,2±22,44	25,31±6,18
GHRP-6	6,71±1,18a	88,27±4,61	11,45±5,98	9,54±2,15
GHRP-2	7,14±1,02a	84,17±7,75	18,12±6,75	11,17±3,33
Гексарелин	6,25±1,73a	88,59±6,58	12,35±8,94	10,18±2,98
Грелин	6,67±1,53a	85,23±4,11	11,27±4,67	10,71±4,57

(a) Представляет значимое различие  $p < 0,01$  между группами, получавшими пептиды, и контрольной группой с солевым раствором. Двусторонний t-критерий Стьюдента.

Как показано, все пептиды обладали в исследуемых дозировках мощным противофиброзным эффектом в используемой экспериментальной системе, который характеризуется резким, быстрым уменьшением избыточного количества коллагенового материала и внеклеточного матрикса, уменьшением количества индукторных клеток (тучных клеток) и эффекторных клеток (фибробластов и

миофибробластов). Примечательно, что после третьей инфльтрации для всех имплантатов, в которые вводили любой из пептидов, наблюдали заметное уменьшение размера, и они становились бледными и нежизнеспособными.

5

### Формула изобретения

1. Фармацевтическая композиция, отличающаяся содержанием GHRP-6 и способная предотвращать, контролировать и элиминировать патологические отложения фиброзного материала и избыток внеклеточного матрикса из внутренних органов и  
10 кожи организма-реципиента.

2. Композиция по п.1, где указанная композиция устраняет внутриклеточные и внеклеточные отложения гиалинового и амилоидного материала, гранулярных форм эозинофильного и/или осмофильного материала из внутренних и наружных органов и  
15 сосудистой сети.

3. Композиция по п.1, где указанная композиция восстанавливает нормальное функционирование любого внутреннего или наружного органа или ткани, пораженных избыточными отложениями фиброзного, амилоидного, осмофильного, эозинофильного или гиалинового материала.

4. Композиция по п.1, где указанную композицию вводят животным или пациентам.

5. Композиция по п.1, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам парентеральным способом, включая внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, интратекальный; или местной инфльтрацией в кожу, на слизистую оболочку, эпителии или органы или, более конкретно, внутрь очага.

25 6. Композиция по п.1, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам интаректальным способом.

7. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам местным способом в виде жидких композиций, компрессов  
30 или твердых или полутвердых композиций.

8. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6, где композиция способна устранять отложения фиброзного материала и избыток внеклеточного матрикса при заболевании печени любого этиопатогенеза, таком как, как правило,  
35 последствия вирусного гепатита, алкоголизм, отравления, аутоиммунное или идиопатическое.

9. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6, где композиция  
40 способна устранять отложения фиброзного материала и избыток внеклеточного матрикса, как правило, токсического, профессионального, лекарственного, радиоактивного, аутоиммунного происхождения, при последствиях астмы, аллергического или идиопатического происхождения в органах, таких как легкие.

10. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить  
45 животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6, где композиция способна устранять отложения фиброзного, фиброгиалинового или амилоидного материала и избыток внеклеточного матрикса в органах, таких как почки, как правило, при нефросклерозе и/или тубулосклерозе диабетического, токсического,  
50 профессионального, лекарственного, аутоиммунного или идиопатического происхождения или при последствиях перенесенных инфекций.

11. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6, где композиция

способна устранять отложения фиброзного, фиброгиалинового или амилоидного материала и избыток внеклеточного матрикса, как правило, аутоиммунного или идиопатического происхождения в коже.

5 12. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 7, где композиция способна устранять отложения фиброзного, фиброгиалинового или амилоидного материала и избыток внеклеточного матрикса из кожи, более конкретно, при келоидах, гипертрофических рубцах или других формах избыточного рубцевания.

10 13. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 7, где композиция способна корректировать эстетический внешний вид кожи после восстановительной, эстетической или аналогичной хирургии.

15 14. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6, где композиция способна устранять отложения фиброзного, фиброгиалинового или амилоидного материала и избыток внеклеточного матрикса из поджелудочной железы и пищеварительного тракта от пищевода до прямой кишки.

20 15. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6, для устранения отложений фиброзного, фиброгиалинового или амилоидного материала и избытка внеклеточного матрикса в сосудистой сети.

25 16. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6, для устранения отложений фиброзного, или амилоидного, и/или осмофильного, или эозинофильного материала в мозге и клетках мозга.

30 17. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6, где композиция способна уменьшать и/или устранять отложение амилоида, и/или гиалина, и/или гранулярных форм эозинофильного и/или осмофильного материала в сосудистой сети организма, включая центральную нервную систему и оболочки мозга.

35 18. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6, где композиция способна уменьшать и/или устранять отложение фиброзных, амилоидных, и/или гиалиновых, и/или гранулярных форм эозинофильного и/или осмофильного материала, как правило, в стенках кровеносных сосудов.

40 19. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6, где композиция способна устранять отложения фиброзных, амилоидных, и/или гиалиновых, и/или гранулярных форм эозинофильного или осмофильного материала из черепных, внечерепных, чувствительных, двигательных или смешанных нервов и/или нервов вегетативной нервной системы.

45 20. Композиция по любому из пп.1-6, где указанную композицию следует вводить животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6, где композиция способна уменьшать и/или устранять отложение фиброзных, амилоидных, и/или гиалиновых, и/или гранулярных форм эозинофильного и/или осмофильного материала, как правило, в стенках кровеносных сосудов.

50 21. Композиция по п.1, отличающаяся содержанием GHRP-6 и способная останавливать и контролировать процессы избыточного перекисного окисления

липидов и оксидативного стресса в клетках, тканях и системных органах, для введения животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6.

5 22. Композиция по п.21, отличающаяся способностью останавливать и контролировать процессы избыточного перекисного окисления липидов и оксидативного стресса, в частности, в центральной нервной системе и периферических нервах, для введения животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6.

10 23. Применение пептида GHRP-6 по любому из пп.1-6 для получения фармацевтической композиции для введения животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 7, где композиция способна устранять отложения фиброзного, фиброгиалинового или амилоидного материала и избыток внеклеточного матрикса из кожи, более конкретно, фиброзные последствия любой формы акне.

15 24. Применение пептида GHRP-6 в фармацевтической композиции, пригодной для прекращения и контролирования процесса старения мозга и нарушения мозговых функций вследствие процессов избыточного перекисного окисления липидов и оксидативного стресса или повреждения сосудистой системы мозга, для введения животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6.

20 25. Применение пептида GHRP-6 по любому из пп.1-6 для получения фармацевтической композиции, пригодной для прекращения и контролирования процесса старения мозга и нарушения мозговых функций вследствие процессов избыточного перекисного окисления липидов и оксидативного стресса или повреждения сосудистой системы мозга, для введения животным или пациентам  
25 любым из способов, описанных в пп.5 и 6.

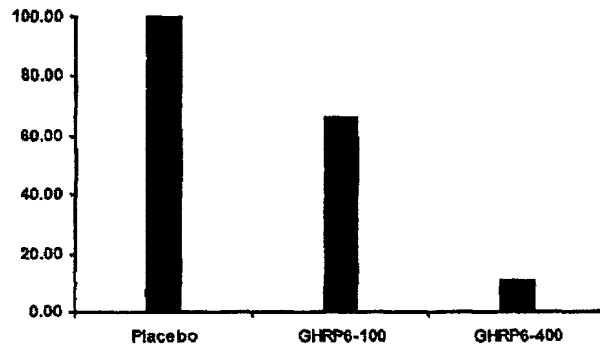
30 26. Применение пептида GHRP-6 по любому из пп.1-6 для изготовления фармацевтической композиции, пригодной для прекращения и контролирования процесса отложения фиброзных, амилоидных, и/или гиалиновых, и/или гранулярных форм эозинофильного и/или осмофильного материала в клетках или тканевом  
внеклеточном пространстве центральной и периферической нервной систем, и для  
35 введения животным или пациентам любым из способов, описанных в пп.5 и 6.

35

40

45

50



ФИГ. 1